



## 明細書

## 新規タンパク質およびそのDNA

## 技術分野

5 本発明は、 $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター活性を有するタンパク質 (SGLT ホモログ)、該タンパク質をコードするDNA、該DNAの一塩基多型 (SNPs) 体、該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などを提供する。

## 背景技術

10 グルコースが細胞内外を移行するには、細胞膜上に糖輸送体と呼ばれる膜タンパクが必要である。

グルコースの輸送体は、受動輸送体である促進拡散型グルコーストランスポーター (GLUT) と  $\text{Na}^+$  イオン輸送と共役することでグルコースを濃度勾配に逆ら

15 って輸送する能動輸送体である  $\text{Na}^+$ /グルコーストランスポーター (SGLT) に大別される。GLUT は、8 種類のアイソフォームが存在し、分子量約 5 万の細胞膜を 12 回貫通する共通構造を有している。

SGLT は、分子量 7.5 万の細胞膜を 14 回貫通する共通構造を有している。

20 日本臨床 55, 1997, 増刊号、糖尿病 1, 59-64 には SGLT1 および 2 の機能や発現部位が概説されている。

ヒト SGLT1 は、小腸、腎臓に特異的に発現しグルコースに対して高親和性で輸送能は小さく、ヒト SGLT2 は、腎臓特異的に発現しグルコースに対して低親和性で輸送能は大きい事が知られている。SGLT は、グルコースの小腸からの吸収と、腎臓から一旦尿中に排出されたグルコースを再吸収する役割を担っている。

25 糖尿病モデルラットにおいて、SGLT を阻害することで、腎臓におけるグルコースの再吸収を抑制し、尿中にグルコースを排出することで血糖を低下する作用が示されている。 (Diabetes 48:1794-1800, 1999)

これまで、 $\beta$  細胞、肝細胞では、受動輸送体である GLUT2 が主に発現していると考えられてきた。GLUT2 はグルコースに対する低い親和性と高い最大輸送

能を特徴とする。 $\beta$  細胞では、血糖値に応じてグルコースを取り込み、グルコキナーゼと共にグルコース濃度依存性のインスリン分泌作用を示すためのグルコースセンサーとして機能していると考えられている。肝細胞では、細胞内外のグルコース濃度勾配に従って、食後高血糖時には血中グルコースを細胞内に取り込み、空腹時にはグリコーゲン分解、あるいは糖新生によって細胞内で作られたグルコースを血中に放出する糖輸送体として機能している。

ヒト SGLT1 は、小腸細胞において消化管ホルモンである GLP-2 の作用で細胞内から膜表面に移行し、糖取り込み活性が 3 倍に増加するという報告 (Am. J. Physiol. 273 R1965-R1971, 1997) がある。

10 現在使用されているインスリン分泌促進薬 (SU 剤) は、 $\beta$  細胞の  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネルを閉鎖することにより、血糖値に関わらず強制的にインスリンを分泌させる。従って、血糖コントロールが難しく低血糖を起したり、過剰なインスリン分泌により肥満を誘発したりする副作用があると考えられている。また、平均して 10 年で薬が効かなくなる SU 剤の二次無効と呼ばれる現象が起きるが、 $\beta$  細胞に疲弊を起す

15 のが原因とも考えられている。

SGLT ホモログ機能を賦活化することにより、 $\beta$  細胞への糖取り込みを促進し、血糖値依存性のインスリン分泌を亢進することが期待できる。また、SGLT 機能の賦活化薬には、現在使用されているインスリン分泌促進薬 (SU 剤) の前記副作用は起きないものと期待される。

20 肝細胞においては、GLUT2 が空腹時は肝臓から血中へグルコースを放出するのに対して、SGLT ホモログは細胞内外のグルコース濃度勾配に関わらず血中から肝臓への糖取り込みを促進するものと考えられ、肝臓から血中への糖放出を抑制することが期待でき、糖尿病患者に認められる空腹時高血糖を低血糖などの副作用を起さずに抑制することが期待できる。

25 さらに、SGLT 阻害薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げることができ、肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制することが期待できる。

発明の開示

本発明者らは、前記の問題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、新規 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポータータンパク質（ヒト SGLT ホモログ、マウス SGLT ホモログおよびラット SGLT ホモログ）を見出した。該ヒト SGLT ホモログ はアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 53%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 53%、マウス SGLT2 と 51%、ラット SGLT1 と 52%およびラット SGLT2 と 51%の高い相性を示し、該マウス SGLT ホモログ はアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 52%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 53%、マウス SGLT2 と 50%、ラット SGLT1 と 52%およびラット SGLT2 と 50%の高い相性を示し、該ラット SGLT ホモログ はアミノ酸レベルで、ヒト SGLT1 と 52%、ヒト SGLT2 と 52%、マウス SGLT1 と 53%、マウス SGLT2 と 49%、ラット SGLT1 と 52%およびラット SGLT2 と 48%の高い相性を示す。該ヒト、マウスおよびラット SGLT ホモログは、何れも 14 回膜貫通型の構造を有しており、グルコースの能動輸送担体として機能し得るものである。該ヒト SGLT ホモログの発現分布はヒト SGLT1、2 と異なり、脾臓、肝臓でもっとも発現が高く、該ラット SGLT ホモログは腎臓で発現が高く、ラット SGLT ホモログは平滑筋および腎臓で発現が高い。

SGLT ホモログを賦活化する方法としては、例えば SGLT ホモログのプロモーターを活性化したり、mRNA を安定化することで発現レベルを亢進することが考えられる。また、SGLT ホモログを細胞内から膜表面に移行し、細胞膜上で機能する SGLT ホモログの数を増やすことも考えられる。

20 本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

25 (2) 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する前記 (1) 項記載のタンパク質またはその塩、

(3) 配列番号：1 5 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(4) 配列番号：1 5 または配列番号：2 6 で表わされるアミノ酸配列を含有する前記 (3) 項記載のタンパク質またはその塩、

(5) 前記 (1) 項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

(6) 前記 (3) 項記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩、

5 (7) 前記 (1) 項記載のタンパク質または前記 (5) 項記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する DNA、

(8) 前記 (3) 項記載のタンパク質または前記 (6) 項記載の部分ペプチドをコードする DNA を含有する DNA、

(9) 配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する前記 (7) 項記載の DNA、

10 (10) 配列番号：7 で表わされる塩基配列を有する前記 (7) 項記載の DNA、

(11) 配列番号：1 6 または配列番号：2 7 で表わされる塩基配列を有する前記 (8) 項記載の DNA、

(12) 前記 (7) 項記載の DNA を含有する組換えベクター、

(13) 前記 (8) 項記載の DNA を含有する組換えベクター、

15 (14) 前記 (12) 項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(15) 前記 (13) 項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(16) 前記 (14) 項記載の形質転換体を培養し、前記 (1) 項記載のタンパク質または前記 (5) 項記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これ採取することを特徴とする前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

20 (17) 前記 (15) 項記載の形質転換体を培養し、前記 (3) 項記載のタンパク質または前記 (6) 項記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これ採取することを特徴とする前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法、

25 (18) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(19) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬、

(20) 前記 (7) 項記載の DNA を含有してなる医薬、

5.

- (21) 前記 (8) 項記載のDNAを含有してなる医薬、  
 (22) 前記 (1) 項または前記 (3) 項記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドもしくは前記 (5) 項または前記 (6) 項記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする診断剤、  
 (23) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、  
 (24) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、  
 (25) 前記 (23) 項または前記 (24) 項記載の抗体を含有することを特徴とする診断剤、  
 (26) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、  
 (27) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、  
 (28) 前記 (7) 項または前記 (8) 項記載のDNAのプロモーター下流にレポーター遺伝子を挿入したDNAを含有する組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いることを特徴とする、前記 (1) 項もしくは前記 (3) 項記載のタンパク質または前記 (5) 項もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドの発現を促進または抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、  
 (29) 前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングキット、  
 (30) 前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチド

6

- またはその塩を含有してなる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニングキット、  
 (31) 前記 (26) 項記載のスクリーニング方法または前記 (29) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、  
 (32) 前記 (27) 項記載のスクリーニング方法または前記 (30) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、  
 (33) 前記 (26) 項記載のスクリーニング方法または前記 (29) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、  
 (34) 前記 (27) 項記載のスクリーニング方法または前記 (30) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、  
 (35) 前記 (26) 項記載のスクリーニング方法または前記 (29) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、  
 (36) 前記 (27) 項記載のスクリーニング方法または前記 (30) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (3) 項記載のタンパク質もしくは前記 (6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる医薬、  
 (37) 前記 (26) 項記載のスクリーニング方法または前記 (29) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記 (1) 項記載のタンパク質もしくは前記 (5) 項記載の部分ペプチド



記(5) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(38) 前記(27) 項記載のスクリーニング方法または前記(30) 項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる前記(3) 項記載のタンパク質もしくは前

5 記(6) 項記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬、

(39) 糖尿病の予防・治療剤である前記(18) 項または前記(20) 項記載の医薬、

10 (40) 糖尿病の予防・治療剤である前記(19) 項または前記(21) 項記載の医薬、

(41) 糖尿病の予防・治療剤である前記(35) 項記載の医薬、

(42) 糖尿病の予防・治療剤である前記(36) 項記載の医薬、

(43) 高脂血症の予防・治療剤である前記(37) 項記載の医薬、

(44) 高脂血症の予防・治療剤である前記(38) 項記載の医薬、

15 (45) 糖尿病・高脂血症の診断剤である前記(22) 項または前記(25) 項記載の診断剤、

(46) 前記(1) 項もしくは前記(3) 項記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは前記(5) 項もしくは前記(6) 項記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法、

20 (47) 前記(23) 項または前記(24) 項記載の抗体を用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法、

(48) 哺乳動物に対して、前記(31) 項または前記(32) 項記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法、

25 (49) 哺乳動物に対して、前記(33) 項または前記(34) 項記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高脂血症の予防・治療方法、

(50) 糖尿病の予防・治療剤を製造するための前記(31) 項または前記(32) 項記載の化合物またはその塩の使用、

(51) 高脂血症の予防・治療剤を製造するための前記(33) 項または前記(3

4) 項記載の化合物またはその塩の使用、

(52) 配列番号: 2、配列番号: 16または配列番号: 27で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型(SNP s) 体、

(53) 配列番号: 40、配列番号: 42または配列番号: 45の何れかで表される塩基配列を含有する前記(52) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体、

5 (54) 前記(52) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体にコードされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

(55) 配列番号: 41、配列番号: 43または配列番号: 46の何れかで表されるアミノ酸配列を含有する前記(54) 項記載のタンパク質またはその塩、

10 (56) 配列番号: 51で表される塩基配列を含有するDNA、

(57) 配列番号: 51で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型(SNP s) 体、

(58) 配列番号: 54、配列番号: 55または配列番号: 56の何れかで表される塩基配列を含有する前記(57) 記載の一塩基多型(SNP s) 体、

15 (59) 前記(52) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体を含有する組換えベクター、

(60) 前記(56) 項記載のDNAまたは前記(57) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体を含有する組換えベクター、

(61) 前記(59) 項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(62) 前記(60) 項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

20 (63) 前記(61) 項記載の形質転換体を培養し、前記(54) 項記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする前記(54) 項記載のタンパク質またはその塩の製造法、

(64) 前記(52) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体を含有してなる医薬、

25 (65) 前記(54) 記載のタンパク質またはその塩を含有してなる医薬、

(66) 糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である前記(64) 項または前記(65) 項記載の医薬、

(67) 前記(52) 項または前記(57) 項記載の一塩基多型(SNP s) 体を含有してなる診断剤、

(68) さらに、配列番号：2、配列番号：16、配列番号：27または配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNAまたはその一部を含有する前記(67)項記載の診断剤。

- (69) 糖尿病または高脂血症の診断剤である前記(67)項記載の診断剤、
- 5 (70) 前記(52)項または前記(57)項記載の一塩基多型(SNPs)体を解析することを特徴とする糖尿病または高脂血症の診断方法などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 図1 ヒトSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。
- 図2 ヒトSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す。
- 10 MTCパネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製)を示す。
- 図3 ヒトSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。
- 図4 マウスSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。
- 15 図5 マウスSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す(左図は雄、右図は雌を示す)。MTCパネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製)を示す。
- 図6 マウスSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。
- 20 図7 ラットSGLTホモログの疎水性プロット図を示す。
- 図8 ラットSGLTホモログの各種組織における発現分布の解析結果を示す。MTCパネルは発現量を標準化したcDNA (clontech 社製)を示す。
- 図9 ラットSGLTホモログ、hSGLT1およびhSGLT2の $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み活性の測定結果を示す。
- 25 図10 抗ヒトSGLTホモログペプチド抗体によるウェスタンブロットティングの結果を示す。
- 図11 ヒトSGLTホモログ構造遺伝子に存在するSNPを示す。
- 図12 pM18S vector 導入COS-7細胞(CCI)の糖取り込み量を1としたときのSNPを有するヒトSGLTホモログ発現細胞の糖取り込み活性の値のグラフを示す。

図13 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域に存在するSNPを示す。

図14 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域の欠失変異体を示す。

図15 シーバンジー・ルシフェラーゼ活性を1としたときのヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域におけるプロモーター活性の値のグラフを示す。

- 6 図16 健康人におけるヒトSGLTホモログのSNP発現頻度を表すグラフを示す(平均年齢42.3歳、n=58)。SNP-P1についてはCをmajor、Tをminorとする。SNP-P2についてはAをmajor、Tをminorとする。SNP-C1についてはGをmajor、Aをminorとする。SNP-C2についてはCをmajor、Tをminorとする。SNP-C3についてはGをmajor、Tをminorとする。

- 10 本発明で用いられる配列番号：1、配列番号：15および配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称する)ともある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサネキウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳線細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、腎臓、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってよく、合成タンパク質であってよい。

配列番号：1、配列番号：15および配列番号：26で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1、配列番号：15および配列

番号：26で表わされるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：1、配列番号：15および配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1、配列番号：15および配列番号：26で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1、配列番号：15および配列番号：26で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

10 実質的に同質の活性としては、例えば、グルコースの能動輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理的に）同質であることを示す。したがって、グルコースの能動輸送活性が同等（例、約0.01~100倍、好ましくは約0.1~10倍、より好ましくは0.5~2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

15 グルコースの能動輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことが出来るが、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999) に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

20 また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、①配列番号：1、配列番号：15または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1

6で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数（1~5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

5 前記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、とくに限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1、配列番号：15または配列番号：26で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

15 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、isonプロピル、n-ブチルなどのC<sub>1-9</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>6-9</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-13</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-9</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-9</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アラキル基、ヒパロイルオキシメチル基などが用いられる。

20 本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミドまたはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば前記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、

あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト脾臓由来のタンパク質、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するマウス腎臓由来のタンパク質および配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するラット腎臓由来のタンパク質などがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明で用いられるタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

10 例えば、本発明で用いられるタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

25 本発明の部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば第176番目～201番目、第471番目～491番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：15で表されるアミノ酸配列において例えば第172番目～197番目、第467番目～487番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：26で表されるアミノ酸配列において例えば第175番目～200番目、第470番目～490番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端が、カルボキシ基（-COO

H）、カルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）、アミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）の何れであってもよい。

さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシ基（またはカルボキシレート）を有しているもの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

10 本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば配列番号：1で表されるアミノ酸配列において第261～275番目、第399～417番目、第500～649番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：15で表されるアミノ酸配列において第257～271番目、第395～413番目、第496～646番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：26で表されるアミノ酸配列において第260～274番目、第398～416番目、第499～648番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

20 本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属）などの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

25 本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準

じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、酸抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせて行うことにより精製分離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAW樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル)-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を得る。

前記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうるものが知られている溶媒から適宜選択される。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、

トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサソラン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5〜4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Bt-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルファエニル、ジフェニルスルフィニオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブチルカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C<sub>1-6</sub>)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(タンパク質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを前記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については前記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、前記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノエステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様に、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodansky および M. A. Ondetti, ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②Schroeder および Luebkke, ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977

年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製分離することができる。前記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、パクリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明で用いられるタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

20

配列番号：7で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：7で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：16で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：16で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：27で表される塩基配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クロニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：7で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：15で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：16で表される塩基配列

21

を含有するDNAなどが用いられ、配列番号：26で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明で用いられる部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列を有するDNAの一部を有するDNA、または配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同様の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質をコードするDNAの一塩基多型 (SNPs) 体としては、例えば、配列番号：2、配列番号：16または配列番号：27で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型 (SNPs) 体などが用いられ、具体的には、配列番号：40、配列番号：42または配列番号：45で表される塩基配列を含有する一塩基多型 (SNPs) 体などが用いられる。

本発明の一塩基多型 (SNPs) 体にコードされるタンパク質としては、具体的には、配列番号：41、配列番号：43または配列番号：46で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが用いられる。

本発明のタンパク質をコードするDNAに対するプロモーターとしては、例えば、配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。



本発明の配列番号：51で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型(SNP s)体としては、例えば、配列番号：54、配列番号：55または配列番号：56で表される塩基配列を含有する一塩基多型(SNP s)体などが用いられる。

- 本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド(以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNA(一塩基多型(SNP s)体も含む)のクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に従って行なうことができる。

- DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express km(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

- クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有している。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(i)本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

- ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、パキューウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

- これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

- 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。

- 選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、



0mpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

10 エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 (プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)), JM103 (ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)), JA221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)), 120巻, 517(1978)), HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)), C600 (ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)) などが用いられる。

20 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)) などが用いられる。

25 酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC 1913, NCYC2036, ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウィルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由

来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはBstigma actea由来の細胞などが用いられる。ウィルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる (前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985))。

10 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエロマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

15 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行うことができる。

20 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行うことができる。

25 酵母を形質転換するには、例えば、メソックス・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行うことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行うことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロト

コール、263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology)、52巻、456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

- 5 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含まれられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

- 15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller)、ジャーナル・オブ・エクス・ペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics)、431-433、Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率的に働かせるために、例えば、3β-インドルリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 20 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることができる。

- 25 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 30 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、パークホルダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、77巻、4505 (1980)) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A. ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad.

Scl. USA)、81巻、5330 (1984) が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 35 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. ら、ネイチャー (Nature)、195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 40 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5〜20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエンス (Science)、122巻、501 (1952))、DME培地 (ヴィロロジー (Virology)、8巻、396 (1959))、RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻、519 (1967))、199培地 (プロシーディングス・オブ・ザ・ソサエティ・オブ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻、1 (1950)) などが用いられる。pHは約6〜8であるのが好ましい。培養は通常約30℃〜40℃で約15〜60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 45 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

- 50 前記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 55 本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離する過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上

清を収める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

10 かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組織え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

# (a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは抗体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の凝集化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した凝集剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256、495（1975））に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは抗体とともに吸着させた固相（例、マイクログロブレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固

相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- 5 モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞培養用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、前記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行なうことができる。

#### （ポリクローナル抗体の作製）

本発明のポリクローナル抗体は、それ公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアータンパク質との複合体をつくり、前記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比

は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカブールさせる方法が用いられる。

- 6 また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは阻体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、前記の方法で免疫された温血動物の血液、尿液など、好ましくは血液から採取することができる。

- 15 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、前記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、前記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、アンチセンスヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

- 25 本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約

70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスヌクレオチドが好適である。

具体的には、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2、配列番号：7、配列番号：16または配列番号：27で表わされる塩基配列を有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスヌクレオチドなどが挙げられる。

アンチセンスヌクレオチドは通常、10〜40個程度、好ましくは15〜30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、ヒトSGLTホモログタンパクと表記することがある）はヒトの膵臓、肝臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、糖尿病における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

ヒトSGLTホモログタンパクの活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば膵β細胞への糖取り込みを促進し、血糖値依存性のインスリン分泌を亢進でき、さらに肝細胞において細胞内外のグルコース濃度勾配に関わらず血中

から肝臓への糖取り込みを促進し肝臓から血中への糖放出を抑制することができるので例えば、糖尿病などの治療・予防剤として使用することができる。

一方、ヒトSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げることで、(糖尿病)肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制することができるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。

配列番号：15で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、マウスSGLTホモログタンパクと表記することがある）はマウスの腎臓において組織特異的に高発現するので、例えば高脂血症などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、高脂血症における早期診断、

マウスSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げることで、(糖尿病)肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制することができるので、例えば高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。

配列番号：26で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、ラットSGLTホモログタンパクと表記することがある）はラットの腎臓において組織特異的に高発現するので、例えば高脂血症などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、高脂血症における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

ラットSGLTホモログタンパクの活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、腎臓からの糖の再吸収を抑制することで血糖を下げることで、(糖尿病)肝臓への糖取り込みを抑制することで脂肪合成を抑制することができるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。

(1) 本発明のタンパク質が関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のタンパク質は、Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーターとしてグルコースの能動輸送活性を有し、膵β細胞への糖取り込み、血糖値依存性のインスリン分泌に寄与している。また、肝細胞においては、細胞内外のグルコース濃度勾配に関わらず血中から肝臓への糖取り込みに寄与している。

したがって、本発明のタンパク質をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合あるいは本発明のタンパク質の発現量が減少している場合には、例えば、糖尿病などの種々の疾患が発症する。

したがって、本発明のタンパク質および本発明のDNAは、例えば、糖尿病などの疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、グルコースの降β細胞への糖取り込み、肝細胞への糖取り込みが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のタンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを前記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を前記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で配合することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られ

るようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに配合することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようないくつかの活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等強液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80™、HCO-50など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンブルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも前記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。とりわけ、ヒトに対して投与するのが好ましい。

本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより

差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき該タンパク質等を約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量5 6 は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60 kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与3 7 することができ。

#### (2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物、またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

- 15 (1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、グルコースの能動輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、
- 20 (2) (1) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の糖取り込み活性と (ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の糖取り込み活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

具体的には、前記スクリーニング方法においては、例えば、(1)と(ii)の場合において、糖取り込み活性を阻害したグルコースまたは2-deoxy-glucoseなどのグルコース類似体の細胞内への蓄積を放射活性で測定し、グルコースの能動輸送3 6 活性の指標として比較することを特徴とするものである。

本発明のスクリーニングにおいては、タンパク質を産生する能力を有する細胞に、グルコースの能動輸送活性阻害剤（例、フロリジン）などをポジティブコントロールとして使用してもよい。

すなわち、本発明は

- (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、阻害したグルコースまたはグルコース類似体を取り込ませると同時にしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性阻害剤を添加した場合と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、阻害したグルコースまたはグルコース類似体を取り込ませると同時にしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性阻害剤または阻害剤、および試験化合物を添加した場合とを比較し、その取り込み量の変化を測定することを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

前記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4～10（望ましくは、pH約6～8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質の $\text{Na}^+$ イオンチャネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。

本発明のタンパク質のグルコースの能動輸送活性は、公知の方法、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

例えば、前記(ii)の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記(1)の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその



塩として選択することができる。

また、例えば、前記 (II) の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記 (I) の場合に比べて、約 20 % 以上、好ましくは 30 % 以上、より好ましくは約 50 % 以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

また、本発明のタンパク質 SGLT ホモログ遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、前記の各種細胞に発現させ、該細胞に前記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質 (SGLT ホモログ) の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

15 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、前記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、グルコースの能動輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩である。

20 該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩は、例えば、ヒトに対して糖尿病に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

25 また、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩は、例えば、高脂血症に対する治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシリ剤、マイクロカ

プセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

6 該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1 ~ 100 mg、

10 好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病治療の目的で本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重 60 kg として）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約 0.01 ~ 30 mg 程度、

15 好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たり

に換算した量を投与することができる。

(3) 本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量  
本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができ、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することと特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

25 (II) 被検液と抗体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化抗体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。



40

前記 (i) の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN末端を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC末端に反応する抗体であることが望ましい。

- また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a'b')$ 、 $Fab'$ 、あるいは  $Fab$  画分を用いてもよい。

- 本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$  などが用いられる。前記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレセニンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

25

抗原あるいは抗体の不溶性に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶性、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラ

41

ス等が挙げられる。

- サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶性担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

- 本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC末端を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC末端部以外、例えばN末端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

- 競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原 (F) と、抗体と結合した標識抗原 (B) とを分離し (B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定

し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、(1)本発明のタンパク質の濃度の減少が検出された場合、例えば、糖尿病などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製する

ために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

#### (4) 遺伝子診断剤

6 本発明のDNAまたは一塩基多型 (SNPs) 体は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物 (例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イス、サル、チンパンジーなど) における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常 (遺伝子異常) を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

10 本発明のDNAを用いる前記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法 (ゲノミクス (Genomics)、第5巻、874~879頁 (1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、第86巻、2766~2770頁 (1989年)) などにより実施することができる。

20 例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、糖尿病などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

25 特に近年、疾患関連遺伝子を探索する上で非常に重要なツールとしてSNPs (single nucleotide polymorphisms、一塩基多型) 体と呼ばれる多型マーカーが登場し、疾患のなり易さ (なり難さ) を規定し、薬剤に対する応答性の違い・副作用の違いにも影響するものとしてにわかに注目を集めている。SNPsのタイピング法としては、その具体的な目的に応じて、直接塩基配列決定法、Invader法、Salper法、MALDI-TOF/MS法、オリゴSNPチップ法などが挙げられる (英徳医学18巻12号、2000年)。

こうした手法により見出された本発明のタンパク質をコードするDNA (プロモーター領域、エキソン、イントロンを含む) に存在するSNPsは、それ自体単独

で、あるいは他の遺伝子上のSNPsや本発明のDNAと併せて解析することにより、糖尿病、高脂血症に対する罹りやすさの判定や発症時期の予測、あるいは糖尿病、高脂血症の診断に有用である。

(5) アンチセンスヌクレオチドを含有する医薬

6 本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能（例、 $\text{Na}^+$ イオンチャネル活性、グルコースの能動輸送活性）を抑制することができるので、例えば、高脂血症などの治療・予防剤として使用することができる。

10 前記アンチセンスヌクレオチドを前記の治療・予防剤として使用する場合は、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

例えば、該アンチセンスヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子株やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

20 該アンチセンスヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、高脂血症の治療の目的で本発明のアンチセンスヌクレオチドを肝臓に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスヌクレオチドを約0.1〜100mg投与する。

さらに、該アンチセンスヌクレオチドは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

(6) DNA導入動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略

記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、  
(2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、

6 (3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および

(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、前記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。

本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現せしめるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イス、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現せしめる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウィルスなどのレトロウィルス、ワクシニアウィルスまたはパキエロウィルスなどの動物ウィルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

前記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウィルス（例、シミアンウィルス、サイトメガロウィルス、モロニー白血病ウィルス、JCウィルス、ス、乳癌ウィルス、ポリオウィルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イス、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来

成長因子β、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心筋ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTle2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼI組織インヒビター、MHCKラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素

6 甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクトチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、パソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウィルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびニトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

前記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウィルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外來性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と細胞領域間あるいは細胞領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

25 正常な本発明のタンパク質の細胞領域は、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イス、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得

することが出来る。また、外来性の異常DNAは、前記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を複製することができる。

該翻訳領域は導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により複製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持すること意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で繁殖させることができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖させることができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関与する疾患の病態機序の解明および

これらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを導入させた哺乳動物は、逆雑した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で雄代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって複製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖させることができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害 (dominant negative作用) を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを導入させた哺乳動物は、逆雑した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、前記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

①組織培養のための細胞源としての使用、

②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、

③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、

④前記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることであり、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができ、

また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることであり、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

(1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、  
(2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第(1)項記載の胚幹細胞、

(3) ネオマイシン耐性である第(1)項記載の胚幹細胞、

(4) 非ヒト哺乳動物がゲッヂ動物である第(1)項記載の胚幹細胞、

(5) ゲッヂ動物がマウスである第(4)項記載の胚幹細胞、

(6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、

(7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッヂ動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(9) ゲッヂ動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および

(10) 第(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を實質的に喪失させることにより、DNAが實質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることにより行なうことができる。これらの変異により、例えば、コードンの読み取り

枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを複製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例として、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（β-ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を入植することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を入植し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲティングベクター上のDNA配列とターゲティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufman の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかでないES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス（C57BL/6とDBA/2とのF1）を用いて樹立したものなども良好に用いうる。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマ

ウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を授卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その一例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10<sup>6</sup>個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞）に再びクロニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-1000 U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で増殖し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが



望まれる。

E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり (M. J. Evans及びH. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシエディンクス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフオロジー、第87巻、27頁、1985年)、本発明のE S細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

15 該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

25 本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプロープとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作

出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

5 該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ固体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

10 卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

15 このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

20 さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

25 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療



法の検討に有用である。

(7a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに

- 5 起因する疾病（例、動脈硬化症、高脂血症、肥満症、糖尿病など）に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供す。

- 10 該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

- 20 試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

例えば、動脈硬化症に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%

以上低下した場合、該試験化合物を動脈硬化症に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、前記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患（例、糖尿病、高脂血症など）に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、前記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様を用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、炭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

25 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~200mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~200mg程度、より好ましくは約0.1~100mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg

当たりに換算した量を投与することができる。

(7b) 本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

前記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。

遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターとしては、例えば、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：53または配列番号：54で表される塩基配列を含有するプロモーターなどが用いられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、β-ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはリジフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試験薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはそ

の組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することに、よって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、1acZをコードするmRNAを検出してよい。

前記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、前記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸、有機酸)や塩基(例、アルカリ金属)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、癸酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、糖尿病などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば、高脂血症などの疾病に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として有用である。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

60

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、糖尿病の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに前記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。また該プロモーター部分を解析することにより新たなシスエレメントやそれに結合する転写因子を見つけることも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

61

cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン

Tyr : チロシン  
 Trp : トリプトファン  
 Pro : プロリン  
 Asn : アスパラギン  
 Gln : グルタミン  
 pGlu : ヒログルタミン酸

また、本明細書中で常用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Me : メチル基  
 Et : エチル基  
 Bu : ブチル基  
 Ph : フェニル基  
 TC : チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基  
 Tos : p-トルエンスルフォニル  
 CHO : ホルミル  
 Bzl : ベンジル  
 Cl<sub>2</sub>-Bzl : 2, 6-ジクロロベンジル  
 Bom : ベンジルオキシメチル  
 Z : ベンジルオキシカルボニル  
 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル  
 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル  
 Boc : t-ブトキシカルボニル  
 DNP : ジニトロフェニル  
 Trt : トリチル  
 Bum : t-ブトキシメチル  
 Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 HOBT : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
 HOObt : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン

HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキサイミド  
 DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

(配列番号: 1)

5 ヒトSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号: 2)

配列番号: 1 で表されるアミノ酸配列を有するヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

(配列番号: 3)

10 実施例1で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

(配列番号: 4)

実施例1で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

(配列番号: 5)

実施例1で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

15 (配列番号: 6)

実施例1で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

(配列番号: 7)

3' 非翻訳領域 (206-3140) を含むヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

20 (配列番号: 8)

実施例2で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。

(配列番号: 9)

実施例2で用いられたプライマー6の塩基配列を示す。

(配列番号: 10)

25 実施例3で用いられたプライマー7の塩基配列を示す。

(配列番号: 11)

実施例3で用いられたプライマー8の塩基配列を示す。

(配列番号: 12)

実施例3で用いられたプライマー9の塩基配列を示す。

64

(配列番号：13)

実施例3で用いられたプライマー9の塩基配列を示す。

(配列番号：14)

実施例3で用いられたプライマー10の塩基配列を示す。

(配列番号：15)

マウスSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

(配列番号：16)

配列番号：15で表されるアミノ酸配列を有するマウスSGLTホモログタンパク質

をコードするDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：17)

実施例6で用いられたプライマー11の塩基配列を示す。

(配列番号：18)

実施例6で用いられたプライマー12の塩基配列を示す。

(配列番号：19)

実施例6で用いられたプライマー13の塩基配列を示す。

(配列番号：20)

実施例6で用いられたプライマー14の塩基配列を示す。

(配列番号：21)

実施例7で用いられたプライマー15の塩基配列を示す。

(配列番号：22)

実施例7で用いられたプライマー16の塩基配列を示す。

(配列番号：23)

実施例7で用いられたプローブの塩基配列を示す。

(配列番号：24)

実施例7で用いられたプライマー17の塩基配列を示す。

(配列番号：25)

実施例7で用いられたプライマー18の塩基配列を示す。

(配列番号：26)

ラットSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

65

(配列番号：27)

配列番号：26で表されるアミノ酸配列を有するラットSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：28)

5 実施例10で用いられたプライマー19の塩基配列を示す。

(配列番号：29)

実施例10で用いられたプライマー20の塩基配列を示す。

(配列番号：30)

実施例10で用いられたプライマー21の塩基配列を示す。

(配列番号：31)

10 実施例10で用いられたプライマー22の塩基配列を示す。

(配列番号：32)

実施例11で用いられたプライマー23の塩基配列を示す。

(配列番号：33)

15 実施例11で用いられたプライマー24の塩基配列を示す。

(配列番号：34)

実施例11で用いられたプローブの塩基配列を示す。

(配列番号：35)

実施例11で用いられたプライマー25の塩基配列を示す。

(配列番号：36)

20 実施例11で用いられたプライマー26の塩基配列を示す。

(配列番号：37)

実施例14で用いられた免疫原ペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：38)

25 実施例17で用いられたC1変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：39)

実施例17で用いられたC2変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：40)

実施例17で得られたC1の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：41)

実施例17で得られたC1の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：42)

実施例17で得られたC2の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

5 (配列番号：43)

実施例17で得られたC2の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：44)

実施例17で用いられたC3変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：45)

10 実施例17で得られたC3の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：46)

実施例17で得られたC3の塩基置換の入ったペプチドのアミノ酸配列を示す。

(配列番号：47)

実施例20で用いられたプライマー27の塩基配列を示す。

15 (配列番号：48)

実施例20で用いられたプライマー28の塩基配列を示す。

(配列番号：49)

実施例20で用いられたプライマーKIの塩基配列を示す。

(配列番号：50)

20 実施例20で用いられたプライマーXIの塩基配列を示す。

(配列番号：51)

実施例20で得られたヒトSGITホモログ遺伝子翻訳開始点の2261bp上流から8bp上流領域のDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：52)

25 実施例21で用いられたP1変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：53)

実施例21で用いられたP2変異導入用プライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：54)

実施例21で得られたP2の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：55)

実施例21で得られたP1の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：56)

5 実施例21で得られたP1およびP2の両方の塩基置換の入ったDNAの塩基配列を示す。

(配列番号：57)

実施例22で用いられたプライマーK2の塩基配列を示す。

(配列番号：58)

実施例22で用いられたプライマーK3の塩基配列を示す。

10 (配列番号：59)

実施例22で用いられたプライマーX2の塩基配列を示す。

(配列番号：60)

実施例24で用いられたプライマー29の塩基配列を示す。

(配列番号：61)

15 実施例24で用いられたプライマー30の塩基配列を示す。

(配列番号：62)

実施例24で用いられたプライマー31の塩基配列を示す。

(配列番号：63)

実施例24で用いられたプライマー32の塩基配列を示す。

20 (配列番号：64)

実施例24で用いられたプライマー33の塩基配列を示す。

(配列番号：65)

実施例24で用いられたプライマー34の塩基配列を示す。

(配列番号：66)

25 実施例24で用いられたプライマー35の塩基配列を示す。

(配列番号：67)

実施例24で用いられたプライマー36の塩基配列を示す。

(配列番号：68)

実施例24で用いられたプライマー37の塩基配列を示す。

(配列番号：6-9)

実施例24で用いられたプライマー3-8の塩基配列を示す。

(配列番号：7-0)

実施例24で用いられたプライマー3-9の塩基配列を示す。

5 (配列番号：7-1)

実施例24で用いられたプライマー4-0の塩基配列を示す。

実施例1で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2193は、2000年(平成12年)12月22日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所：NIBH)に受託番号FERM BP-7410として、2000年(平成12年)12月14日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16516として寄託されている。

15 実施例2で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /TUD-1は、2001年(平成13年)6月14日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7629として、2001年(平成13年)6月5日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16648として寄託されている。

25 実施例6で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2238は、2001年(平成13年)10月15日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7776として、2001年(平成13年)9月27日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16708として寄託されている。

実施例10で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5

$\alpha$ /pTB2239は、2001年(平成13年)10月15日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7777として、2001年(平成13年)9月27日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16709として寄託されている。

実施例17で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue/pTB2251は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7815として、2001年(平成13年)11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16726として寄託されている。

15 実施例17で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue/pTB2252は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7816として、2001年(平成13年)11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16727として寄託されている。

20 実施例17で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2253は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7817として、2001年(平成13年)11月13日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 16728として寄託されている。

実施例20で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue/pTB2254は、2001年(平成13年)12月6日から茨城県つくば市

東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7818として、2001年(平成13年)11月20日から大阪府淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO 16729として寄託されている。

実施例 2' で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue/pTB255 は、2001 年 (平成 13 年) 12 月 6 日から茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-7819 として、2001 年 (平成 13 年) 11 月 20 日から大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 (郵便番号 532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16730 として寄託されている。

実施例 2 1 で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) XL1-Blue/pTB2256 は、2001 年 (平成 13 年) 1 月 26 日から茨城県つくば市 東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号 FERM BP-7820 として、2001 年 (平成 13 年) 1 月 20 日から大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85 (郵便番号 532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に受託番号 IFO 16731 として寄託されている。

20 実施例21で得られた形質転換体エシエリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5  
α/pTB2257は、2001年(平成13年)12月19日から茨城県つくば市東1  
丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術  
総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7832として、  
2001年(平成13年)11月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1  
7-85(郵便番号532-8686)の財団法人・発酵研究所(IFO)に受  
託番号IFO 16732として寄託されている。

## 实施例

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限

71

定されるものではない。なお、大腸菌を用いた遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例 1 ヒト脾臓由来 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポータータンパク質をコードする cDNA のクロニングと塩基配列の決定

ヒト脾臓 cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー-1 (配列番号: 3) およびプライマー-2 (配列番号: 4) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は前記 cDNA 1  $\mu$ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、プライマー-1 (配列番号: 3) およびプライマー-2 (配列番号: 4) を各 0.5  $\mu$ M、dNTPs を 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを 5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 分の後、96 $^{\circ}$ C  $\cdot$  20 秒、60 $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒、72 $^{\circ}$ C  $\cdot$  2 分のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C  $\cdot$  7 分の伸

長反応を行った。さらに、該 PCR 反応産物を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー-3 (配列番号: 5) およびプライマー-4 (配列番号: 6) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は前記 PCR 反応産物 1  $\mu$ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、プライマー-3 (配列番号: 6) およびプライマー-4 (配列番号: 6) を各 0.5  $\mu$ M、dNTPs を 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファを 5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分の後、98 $^{\circ}$ C $\cdot$ 20 秒、60 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒、72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 3 分のサイクルを 35 回繰り返し、その後

20 に 72℃・1 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物およびプラスミドベクター pNE18S を制限酵素 *Eco*RI, *Spe*I で 37℃、一夜切断処理した。1% アガロースゲル電気泳動し、2 Kbp DNA 断片 (*S*GLT ホモログ)、3Kbp DNA 断片 (pNE18S) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、*S*GLT ホモログを pNE18S ヘサブクロニンゲした。これを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、cDNA をアンピシリンを

25 含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクロノンの配列を解析した結果、新組 Na $\gamma$



菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2193 と命名した。

ヒト SGLT ホモログの疎水性プロット図を図1に示す。

実施例2 ヒト肝臓由来 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポータータンパク質をコードする cDNA のクローニングと塩基配列の決定

5 ClonCapture cDNA Selection Kit (CLONTECH 社) の処方に従い、ヒト肝臓 cDNA ライブラリー (CLONTECH 社) からクローニングした。ピオチン化プロローブは、ヒト SGLT ホモログ cDNA を鋳型として、プライマー 5 (5'-ggctgcggggcgtgatgg-3') (配列番号: 8)、プライマー 6 (5'-aggctggcgctgggaagagaac-3') (配列番号: 9) を用いて PCR 反応で増幅した 403 bp 断片を使用した。SGLT ホモログ cDNA の入った大腸菌の選択は、プライマー-1, 2 を用いてコロニー-PCR で行った。得られたクローニングの塩基配列を解析した結果、3' 非翻訳領域 (2026-3140) を含む SGLT ホモログタンパク質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 7) を得た。また形質転換体を大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /TKD-1 と命名した。

15 実施例3 Taqman PCR によるヒト SGLT ホモログの発現分布の解析

Taqman PCR に用いるプライマーおよびプロローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムズジャパン) を用いて検索し、

プライマー-7 (5'-cccgatgcttcacattcttc-3') (配列番号: 10)、

プライマー-8 (5'-acaatgacctgctcgtgcacc-3') (配列番号: 11)、

20 プロローブ (5'-acaatcctggccaggctcatttctgg-3') (配列番号: 12)

を選択した。プロローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダード DNA として、ヒト SGLT ホモログの PCR 断片を使用した。PCR 反応における反応液の組成は pTB2193 DNA 1  $\mu$ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、プライマー-9 (5'-ggggccgcagagatccaggctga-3') (配列番号: 13) およびプライマー-10 (5'-gcaatcatcagccccccgcagac-3') (配列番号: 14) を各 0.5  $\mu$ M、dNTPs を 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを 5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、60°C・30 秒、72°C・1 分のサイクルを 35 回繰り返す。最後に 72°C・7 分の伸長反

応を行った。該 PCR 反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動し、0.7 Kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。該 PCR 断片を 10<sup>4</sup> - 10<sup>6</sup> コピー/ $\mu$ l に調整してスタンダード DNA として使用した。

5 各組織の cDNA ソースとして、Human Multiple Tissue cDNA Panel I および II (CLONTECH Laboratories, Inc.) を使用した。プライマー-7 200nM、プライマー-8 100nM、プロローブ 50nM、鋳型 DNA に、Taqman Universal PCR Master Mix (PE バイオシステムズジャパン) を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズジャパン) で PCR 反応および解析を行った。

10 結果を図2に示した。主に脾臓、肝臓でヒト SGLT ホモログの発現が見られた。

実施例4 SGLT 発現細胞の作成

Human SGLT1 (NCBI Accession NM\_000343) および SGLT2 (NCBI Accession NM\_003041) の cDNA を、Clontech MTC panel kidney cDNA library から PCR 法によって増幅し、動物細胞発現ベクター pME18S の EcoRI, SpeI site にクローニングすることにより pME18S-hSGLT1 および pME18S-hSGLT2 を作成した。プラスミド pME18S、pME18S-SGLT ホモログ、pME18S-hSGLT1、pME18S-hSGLT2 各 5  $\mu$ g と動物細胞発現ベクター pRSVneo 0.5  $\mu$ g を LipofectAMINE PLUS 法 (GIBCOBRL) で CHO 細胞 (1x10<sup>6</sup> cells) に共導入した。G418 (500  $\mu$ g/ml)、10% FBS 添加 DMEM 培地で2週間培養し、薬剤耐性細胞を選択した。

20 G418 耐性 CHO 細胞から、RNAeasy mini キット (Qiagen) を用いて、トータル RNA を抽出した。Taqman Gold RT-PCR キット (PE biosystems) を用い、Taqman PCR 法で SGLT ホモログ、hSGLT1、hSGLT2 の発現量を測定し、各遺伝子を発現している CHO 細胞を選択した。

25 実施例5 糖取りこみ量の測定

SGLT ホモログ、hSGLT1、hSGLT2 発現 CHO 細胞 および pME18S 導入 CHO 細胞の  $\alpha$ -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270 : G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest 93 : 397-404, 1994 の方法に従った。細胞を 96well プレートに 1x10<sup>5</sup> 細胞 / well、100  $\mu$ l 10% FBS 添加 DMEM 培地で増殖し、37°C、

一夜培養した。細胞をバッファー (125 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.1 mg/ml BSA) 150  $\mu\text{l}$  で3回洗浄後同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよびKClをNaClあるいはNaCl + 10  $\mu\text{M}$  あるいは100  $\mu\text{M}$  Phlorizin (Sigma 社) に置き換えたバッファー 90  $\mu\text{l}$  を添加した。1 mM  $\alpha$ -Methyl Glucose を各 well に10  $\mu\text{l}$  ( $^{14}\text{C}$ )  $\alpha$ -Methyl Glucose (アマシヤム アルマシア バイオテック社) 0.02  $\mu\text{Ci}$  を含む) 添加し1時間後、冷 PBS バッファー 200  $\mu\text{l}$  で3回洗浄した。各 well に液体シンチレータ 100  $\mu\text{l}$  を添加し、細胞に取り込まれた $^{14}\text{C}$ のカウントを測定した。

10 結果を図3に示した。SGLT ホモログは、hSGLT1, hSGLT2 と同様に、Na 濃度依存して SGLT によって選択的に細胞内に取り込まれるグルコースアナログである  $\alpha$ -Methyl Glucose を取り込み、この活性は Phlorizin によって阻害されたことから、SGLT の機能を持つことが証明された。

実施例6 マウス腎臓由来 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をコードする

15 cDNA のクローニングと塩基配列決定

マウス腎臓 cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー11 (配列番号: 17) およびプライマー12 (配列番号: 18) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 1  $\mu\text{l}$  を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu\text{l}$  量、プライマー11 (配列番号: 17) およびプライマー12 (配列番号: 18) を各 0.5  $\mu\text{M}$ 、dNTPs を 200  $\mu\text{M}$ 、および酵素に添付のバッファーを 5  $\mu\text{l}$  加え、50  $\mu\text{l}$  の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ ・1分、96 $^{\circ}\text{C}$ ・20秒、62 $^{\circ}\text{C}$ ・30秒、72 $^{\circ}\text{C}$ ・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72 $^{\circ}\text{C}$ ・7分の伸長反応を行った。さらに該PCR反応産物を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー13 (配列番号: 19) およびプライマー14 (配列番号: 20) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記PCR反応産物 1  $\mu\text{l}$  を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu\text{l}$  量、プライマー13 (配列番号: 19) およびプライマー14 (配列番号: 20) を各 0.5  $\mu\text{M}$ 、dNTPs を 200  $\mu\text{M}$ 、および酵素に添付のバッファーを 5  $\mu\text{l}$  加え、50  $\mu\text{l}$  の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ ・1分、96 $^{\circ}\text{C}$ ・20秒、62 $^{\circ}\text{C}$ ・30秒、72 $^{\circ}\text{C}$ ・2分30秒のサイクルを40回

繰り返し、最後に72 $^{\circ}\text{C}$ ・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびプラスミドベクター-pME18S を制限酵素 BcoRI、SpeI で37 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜切断処理した。1% アガロースゲル電気泳動し、2Kbp DNA 断片 (マウス SGLT ホモログ)、3Kbp DNA 断片 (pME18S) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、SGLT ホモログをpME18S ヘサブクロニングした。これを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、cDNA を持つクローニングをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローニングの配列を解析した結果、新規 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をコードする cDNA 配列 (配列番号: 16) を得た。これらのアミノ酸配列 (配列番号: 15) を含有する新規 Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をマウス SGLT ホモログとした。また、形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pTB2238 と命名した。

マウス SGLT ホモログの疎水性プロット図を図4に示す。

実施例7 TaqMan PCR によるマウス SGLT ホモログの発現分布の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムズジャパン) を用いて検索し、

プライマー15 (5' -tgacagaccagctgattg-3') (配列番号: 21)

プライマー16 (5' -gcacggagcctcccttg-3') (配列番号: 22)

プローブ (5' -ctgcgcgcacacaaatcttccacatg-3') (配列番号: 23)

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダード DNA としてマウス SGLT ホモログのPCR断片を使用した。PCR 反応における反応液の組成は pTB2238 DNA 1  $\mu\text{l}$  を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu\text{l}$  量、プライマー17 (5' -atctctaaigtccagcaatg-3') (配列番号: 24) およびプライマー18 (5' -accagcttgggtaggcaat-3') (配列番号: 25) を各 0.5  $\mu\text{M}$ 、dNTPs を 200  $\mu\text{M}$ 、および酵素に添付のバッファーを 5  $\mu\text{l}$  加え、50  $\mu\text{l}$  の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}\text{C}$ ・1分、96 $^{\circ}\text{C}$ ・20秒、62 $^{\circ}\text{C}$ ・30秒、72 $^{\circ}\text{C}$ ・30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72 $^{\circ}\text{C}$ ・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲル電気泳動し、0.9Kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いてDNAを抽出した。

該PCR断片を $10^3$ - $10^4$ コピー/ $\mu$ lに調整してスタンダードDNAとして使用した。

- 各組織のcDNAソースとして、6週齢のC57BL/6マウス(チャールズリバー社)より肝臓、腎臓、脾臓、骨格筋、白色脂肪組織、褐色脂肪組織を摘出、ここからtotal RNAを抽出した。total RNAの抽出はISOGEN(ニッポンジーン社)の方法に従った。得られたRNA0.1 $\mu$ gを鋳型としてTaqMan Reverse Transcription Reagents (Roche社)の方法に従い、cDNAを合成した。このcDNA1 $\mu$ lを鋳型とし、プライマー15 (配列番号: 21) 200nM、プライマー16 (配列番号: 22) 200nM、プローブ (配列番号: 23) 50nM、にTaqMan universal PCR Master mix (PE バイオシステムズジャパン)を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system (PE バイオシステムズジャパン)でPCR反応および解析を行った。
- 10 各組織のmRNA量はGAPDH値で補正した。GAPDHはTaqMan Rodent GAPDH Control Reagents VIC Probe (アプライドバイオシステムズジャパン)を使用し、上記と同様に添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection systemでPCR反応および解析を行った。

- 15 結果を図5に示した。マウスSGLTホモログは腎臓で高い発現が認められた。
- 実施例8 マウスSGLTホモログ発現細胞の作成

Human SGLT1 (NCBI Accession NM-000343)のcDNAをClontech MTC panel kidney cDNA libraryからPCR法によって増幅し、動物細胞発現ベクターpMB18SのEcoRI、SpeI siteにサブクローニングすることによりpMB18S-hSGLT1を作成した。

20 プラスミドpMB18S、pMB18S-hSGLT1、およびpMB18S-マウスSGLTホモログ各1 $\mu$ gをPucEN6法 (Roche社)でCOST細胞( $5 \times 10^4$ 細胞)に導入した。

#### 実施例9 糖取り込み量の測定

pMB18S、hSGLT1およびマウスSGLTホモログ導入COST細胞の $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従った。細胞を96穴プレートに $3 \times 10^4$ 細胞/well、100 $\mu$ l 10X PBS 添加DMEM培地で播種し、37°Cで一晩培養した。細胞をバッファA (125mM KCl, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH7.2), 0.1mg/ml BSA) 150 $\mu$ lで3回洗浄後、同バッファAで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファAを除去し、同バッファAおよび

KClをNaCl、あるいはNaCl+100 $\mu$ M phlorizin (Sigma社)、あるいはNaCl+1mM phlorizinに置き換えたバッファ90 $\mu$ lを添加した。1mM  $\alpha$ -Methyl Glucoseを各wellに10 $\mu$ l (<sup>14</sup>C)  $\alpha$ -Methyl Glucose (アマシャム ファルマシア バイオテック社) 0.02 $\mu$ Clを含む)を添加し、1時間後、冷PBSバッファ200 $\mu$ lで3回洗浄した。各wellに液体シンチレータ100 $\mu$ lを添加し、細胞に取り込まれた<sup>14</sup>Cのカウントを測定した。

結果を図6に示した。マウスSGLTホモログは、hSGLT1と同様に、Na<sup>+</sup>依存性にSGLTによって選択的に細胞内に取り込まれるグルコースアナログである $\alpha$ -Methyl Glucoseを取り込み、この活性はphlorizinによって阻害されたことから、SGLTの機能を持つことが証明された。

10 実施例10 ラット腎臓由来Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列決定

ラット腎臓cDNA (CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー19 (配列番号: 28) およびプライマー20 (配列番号: 29) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNA 1 $\mu$ lを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1 $\mu$ l量、プライマー19 (配列番号: 28) およびプライマー20 (配列番号: 29) を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファAを5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94°C・1分、96°C・20秒、62°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。さらに該PCR反応産物を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー21 (配列番号: 30) およびプライマー22 (配列番号: 31) を用いてPCR反応を行った。

該反応における反応液の組成は上記PCR反応産物1 $\mu$ lを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE社) 1 $\mu$ l量、プライマー21 (配列番号: 30) およびプライマー22 (配列番号: 31) を各0.5 $\mu$ M、dNTPsを200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファAを5 $\mu$ l加え、50 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、94°C・1分、96°C・20秒、62°C・30秒、72°C・2分30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72°C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびプラスミドベクターpMB18Sを制限酵素EcoRI、SpeIで37°C、一夜切断処理した。1%アガロースゲル電気泳動し、2Kbp DNA断片 (ラットSGLTホモログ)、3Kbp DNA断片 (pMB18S) を切り出し、ゲルエクスト

ラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、SGLTホモログをpME18Sへサブクローニングした。これを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をコードするcDNA配列 (配列番号: 27) を得た。これらのアミノ酸配列 (配列番号: 26) を含有する新規Na<sup>+</sup>/グルコーストランスポーター蛋白質をラットSGLTホモログとした。また、形質転換体が大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2239 と命名した。

ラットSGLTホモログの疎水性プロット図を図7に示す。

#### 10 実施例 1.1 TaqMan PCRによるラットSGLTホモログの発現分布の解析

TaqMan PCRに用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PEバイオシステムズジャパン) を用いて検索し、

プライマー-23 (5' -ctcacagctctggccacctg-3') (配列番号: 32)

プライマー-24 (5' -agaacccggctctctctggag-3') (配列番号: 33)

プローブ (5' -tgcacgacacaggatgtgtc-3') (配列番号: 34)

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM(6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダードDNAとしてラットSGLTホモログのPCR断片を使用した。PCR反応における反応液の組成はpTB2239 DNA 1  $\mu$ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、プライマー-25 (5' -tctggagtcagcttcacacct-3') (配列番号: 35) およびプライマー-26 (5' -cagctcttcagctggcctcag-3') (配列番号: 36) を各0.5  $\mu$ M、dNTPsを200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファを5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・20秒、62 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・30秒のサイクルを40回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲル電気泳動し、0.9kb DNA断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出した。該PCR断片を10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup>コピー/ $\mu$ l に調整してスタンダードDNAとして使用した。

各組織のcDNAソースとして、Sprague-Dawley Rat Poly A<sup>+</sup> RNA (CLONTECH社) (Brain,

Heart, Kidney, Liver, Lung, Pancreas, Retina, Skeletal Muscle, Smooth muscle, Spleen, Testis) を使用した。このRNA0.1  $\mu$ g を鋳型としてTaqMan Reverse Transcription Reagents (Roche社) の方法に従い、cDNAを合成した。このcDNA1  $\mu$ l を鋳型とし、プライマー-23 (配列番号: 32) 200nM、プライマー-24 (配列番号: 33) 200nM、プローブ (配列番号: 34) 50nM、にTaqMan universal PCR Master mix (PEバイオシステムズジャパン) を添付着類配載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system (PE バイオシステムズジャパン) でPCR反応および解析を行った。各組織のmRNA量はGAPDH値で補正した。GAPDHはTaqMan Rodent GAPDH Control Reagents VIC Probe (アプライドバイオシステムズジャパン) を使用し、上記と同様に添付着類配載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection systemでPCR反応および解析を行った。

結果を図8に示した。ラットSGLTホモログは腎臓と平滑筋において高い発現が認められた。

#### 実施例 1.2 ラットSGLTホモログ発現細胞の作成

Human SGLT1 (NCBI Accession NM-000343) のcDNAをClontech HTC panel kidney cDNA library からPCR法によって増幅し、動物細胞発現ベクター-pME18SのEcoRI、SpeI siteにサブクローニングすることによりpME18S-hSGLT1を作成した。プラスミドpME18S、pME18S-hSGLT1、およびpME18S-ラットSGLTホモログ各1  $\mu$ gをpUCNE6法 (Roche社) でCOS7細胞 (5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞) に導入した。

#### 20 実施例 1.3 糖取り込み量の測定

pME18S、hSGLT1およびラットSGLTホモログ導入COS7細胞の $\alpha$ -Methyl Glucoseの取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996およびJ. Clin. Invest. 93:397-404, 1994の方法に従った。細胞を96穴プレートに3 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/well、100  $\mu$ l 10%FBS添加DMEM培地で増殖し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。細胞をバッファ (1.2 mM KCl, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH 7.2), 0.1mg/ml BSA) 150  $\mu$ l で3回洗浄後、同バッファで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファを除去し、同バッファおよびKClをNaCl、あるいはNaCl+100  $\mu$ M phlorizin (Sigma社)、あるいはNaCl+1mM phlorizin に置き換えたバッファ90  $\mu$ l を添加した。1mM  $\alpha$ -Methyl Glucoseを各wellに10

μl ( [<sup>14</sup>C] α-Methyl Glucose (アマシヤム フアルマシア、バイオテック社) 0.02 μCi を含む) を添加し、1時間後、冷PBS/バッファ-200 μl で3回洗浄した。各well に液体シンチレータ100 μl を添加し、細胞に取り込まれた<sup>14</sup>Cのカウントを測定した。結果を図9に示した。ラットSGLTホモログは、hSGLT1と同様に、Na<sup>+</sup>依存性にSGLT1によって選択的に細胞内に取り込まれるグルコースアナログである α-Methyl Glucoseを取り込み、この活性はphlorizinによって阻害されたことから、SGLT1の機能を持つことが証明された。

#### 実施例 14 抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体の作製

ヒト SGLT ホモログの 261-275 の 275 番目のアミノ酸残基にシステインをつけたもの (クラボウ社) を免疫原ペプチドとして使用した (配列番号: 37)。N-(γ-マレイミドブチリロキシ) サクシニミド (QMB) と Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を混合し、室温で 40 分反応した。セファデックス G-25 カラムで分画し、マレイミド基の導入された KLH を得た。免疫原ペプチド 5mg とマレイミド基の導入された KLH を等量混合し 4°C で 1 日間反応した。PBS buffer で 2 日間透析し、PBS buffer に 1mg/ml の濃度で懸濁した。

完全フロイントアジュバントと抗原を等量で混合し (トータル 0.6 ml)、3ヶ月齢の New Zealand white rabbit に皮下免疫した。以後、2〜3週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに 3 回追加免疫した。

5mg の合成ペプチドと Sulfo-Link gel 5ml を、システインを介して結合させ、PBS buffer で平衡化した。5ml の抗血清を、ペプチドを結合したゲルに通し、PBS buffer (5 ml) で 3 回洗浄した。ペプチドに結合した抗体を 0.1N グリシン-HCl buffer (pH 2.5) 8 ml で溶出した。2.4 ml の Tris buffer で中和し、抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体とした。

実施例 15 抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体によるウエスタンブロットティング

ヒト SGLT ホモログ、hSGLT1、hSGLT2 発現 CHO 細胞および pMD18S ベクター導入 CHO 細胞に対し、抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。各細胞を 6well プレートに  $1 \times 10^6$  細胞/2ml 10% FBS 添加 MEM α 培地/well で播種し、37°C、一夜培養した。細胞をバッファ- (62.5mM

Tris (pH 6.8)、2% SDS) に懸濁し、超音波破砕機で細胞を破砕した。5% 容 2-メルカプトエタノール、10% 容 グリセロールを加え、5 分煮沸した後、氷冷した。各サンプル 50 μg 相当量を取り、7.5% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行った。泳動したゲルをセミドライトランスファ-法でニトロセルロースメンブレン (BIO-RAD 社) に転写した。転写したニトロセルロースメンブレンを 5% スキムミルクを溶解した TBST バッファ- (10mM Tris (pH 7.6)、150mM NaCl、0.05% Tween20) 溶液中で、4°C で一晩反応させた。1 次抗体溶液として抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体を TBST バッファ- で 50 倍に希釈したものを扱い、メンブレンを抗体溶液中で室温で 4 時間反応させた。メンブレンを TBST バッファ- で 5 回洗浄した後、二次抗体として抗ラビット-HRP 抗体 (アマシヤムフアルマシア社) を TBST バッファ- で 10000 倍希釈したものを加えた。室温で 1 時間反応させ、その後 TBST バッファ- で 5 回洗浄した。ルネッサンス<sup>®</sup> ルミノール ウェスタンブロット化学発光検出試薬プラス (NEN life science 社) 溶液中で 1 分反応させ、X 線フィルムで現像した。

5 結果を図 10 に示した。抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体が矢印で示したヒト SGLT ホモログを特異的に認識することが証明された。

実施例 16 抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体によるヒト脾臓、肝臓切片の免疫染色

PCR 解析の結果から SGLT ホモログ遺伝子はヒトでは脾臓、肝臓及び腎臓に多く発現していることがわかった。そこで SGLT ホモログ遺伝子の糖尿病治療薬開発上の標的臓器を同定し、その遺伝子機能を明らかにするため、抗ヒト SGLT ホモログポリクローナル抗体 (クラボウ) を用いて正常ヒト脾臓及び肝臓での SGLT ホモログ遺伝子の発現を免疫染色法によって調べた。

正常ヒト脾臓及び肝臓の組織サンブルは Biochain 社から購入した。倫理上問題のないとされる市販スライドグラスを用いた。切片の一部は脱パラフィン後、定法に従ってヘマトキシリンエオジン染色を行い封入し、形態学的観察を行った (組織学研究法、佐野豊、南山堂、1985 年)。さらに同じロットのほぼ連続と考えられる切片について、抗ヒト SGLT ホモログポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。組織のマウントされたスライドグラスを脱パラフィン後、免疫染色を行っ

た。免疫染色はベクタステイン ABC キット (ペルオキシダーゼ法、ベクター社) を用いて行った。発色基質には DAB を用いた。具体的な実験手順はキット添付のマニュアルに従って行った。

SGLT ホモログ遺伝子の発現は脾臓では腫瘍細胞に強く見られ、肝臓では肝実質細胞全体に渡って発現が見られた。また肝実質細胞内での発現に極性は見られなかった。

#### 実施例 17 SNP を有するヒト SGLT ホモログ発現ベクターの作製

Celela 社 SNP データベースを検索するとヒト SGLT ホモログ構造遺伝子には、3ヶ所 SNP が認められた (図 11)。G433A の塩基置換は、Val145Met のアミノ酸置換を起し、これを SNP C1 と命名した。G786T の塩基置換は、Met262Ile のアミノ酸置換を起し、これを SNP C2 と命名した。G1756T の塩基置換は、Glu586S10p のアミノ酸置換を起し、これを SNP C3 と命名した。

SNP C1, C2 の塩基置換は、pME18S-ヒト SGLT ホモログ (pTB2193) DNA に QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE 社) を用いて導出した。pTB2193 10ng、反応 buffer 5 $\mu$ l、C1 変異導入用プライマー (配列番号: 38) あるいは C2 変異導入用プライマー (配列番号: 39) 125ng、dNTP mix 1 $\mu$ l、QuickSolution 3 $\mu$ l に蒸留水を添加して 50 $\mu$ l とし、Pfu Turbo DNA Polymerase (2.5U/ $\mu$ l) を 1 $\mu$ l 添加した。PCR 反応は、95 $^{\circ}$ C・1 分の後、95 $^{\circ}$ C・50 秒、60 $^{\circ}$ C・50 秒、68 $^{\circ}$ C・12 分のサイクルを 18 回繰り返す、最後に 68 $^{\circ}$ C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物に制限酵素 DpnI (10U) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応し、メチル化された親鎖 DNA を切断した。これを大腸菌 XL1-Blue に導入し、cDNA を持つクロノンを、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクロノンの配列を解析し、C1 の塩基置換の入った cDNA 配列 (配列番号: 40)、アミノ酸配列 (配列番号: 41) を得た。また形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue /pTB2251 と命名した。次に C2 の塩基置換の入った cDNA 配列 (配列番号: 42)、アミノ酸配列 (配列番号: 43) を得た。また形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue /pTB2252 と命名した。

SNP C3 の塩基置換は、pME18S-ヒト SGLT ホモログ (pTB2193) DNA を鋳型とし、2 個のプライマー、プライマー-3 (配列番号: 5) および C3 変異導入用プライマー (配

列番号: 44) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は上記 DNA 10ng を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1 $\mu$ l 量、プライマー-3 (配列番号: 5) および C3 変異導入用プライマー (配列番号: 44) を各 0.5 $\mu$ l 量、dNTPs を 200 $\mu$ l 量、および酵素に添付のバッファーを 5 $\mu$ l に加え、50 $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C・1 分の後、95 $^{\circ}$ C・20 秒、62 $^{\circ}$ C・30 秒、72 $^{\circ}$ C・2 分 30 秒のサイクルを 40 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物およびプラスミドベクター pME18S を制限酵素 EcoRI (10U)、SpeI (10U) で 37 $^{\circ}$ C、一夜切断処理した。18 アガロースゲル電気泳動し、1.8 Kbp DNA 断片 (SGLT ホモログ)、3Kbp DNA 断片 (pME18S) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、C3 変異の導入された SGLT ホモログを pME18S ヘサブクロニングした。これを大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、cDNA を持つクロノンを、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のクロノンの配列を解析した結果、C3 変異の導入された cDNA 配列 (配列番号: 45)、アミノ酸配列 (配列番号: 46) を得た。また形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) DH5 $\alpha$  /pTB2253 と命名した。

#### 実施例 18 SNP を有するヒト SGLT ホモログ発現細胞の作製

動物細胞発現ベクター pME18S、pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒト SGLT ホモログ (pTB2193)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C1 (pTB2251)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C2 (pTB2252)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C3 (pTB2253) 各 1 $\mu$ g と PuGENE 6 (Roche 社) 3 $\mu$ l を Opti-MEM (Gibco-BRL 社) 100 $\mu$ l に添加し、15 分間室温で放置した後、COS7 細胞 (1 $\times 10^4$  細胞/1ml 10% FBS 添加 DMEM 培地 / 6 well plate) に添加し、遺伝子を導入した。

#### 実施例 19 SNP を有するヒト SGLT ホモログ発現細胞の精取り込み活性の測定

pME18S、pME18S-hSGLT2 および pME18S-ヒト SGLT ホモログ (pTB2193)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C1 (pTB2251)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C2 (pTB2252)、pME18S-ヒト SGLT ホモログ SNP-C3 (pTB2253) 導入 COS7 細胞の  $\alpha$ -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest. 93:397-404, 1994 の方法に従った。遺伝子導入処理した細胞は、一日培養後 36 穴プレートに 3 $\times 10^4$  細胞/well、100 $\mu$ l 10% FBS 添加 DMEM 培地で播種し、37 $^{\circ}$ C で一夜培

養した。細胞をバッファァー (125mM KCl, 1.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub>, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH7.2), 0.1mg/ml BSA) 150μlで3回洗浄後、同バッファァーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファァーを除去し、同バッファァーおよびKClをNaCl、あるいはNaCl+100μM phloretin (Sigma社)、あるいはNaCl+1mM phloretinに置き換えたバッファァー90μlを添加した。1mM α-Methyl Glucoseを各wellに10μl ( [<sup>14</sup>C] α-Methyl Glucose (アマシャム フォルマシア バイオテック社) 0.02μCiを含む) を添加し、1時間後、冷PBS/バッファァー200μlで3回洗浄した。各wellに液体シンチレータ100μlを添加し、細胞に取り込まれた<sup>14</sup>Cのカウントを測定した。

10 pME18S vector 導入COS-7細胞 (KCl)の糖取り込み量を1として、結果を図12に示した。ヒトSGLT ホモログは、hSGLT2と同様に、NaClで糖取り込みが上昇し、SGLTの特異的阻害剤フロリジンによって抑制された。SNP C1は、NaClによる糖取り込み活性の上昇が低下していた。SNP C2は、糖取り込み活性に有意な差は認められなかった。SNP C3は、NaClによる糖取り込み活性の上昇が消失していた。

15 実施例20 ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域のクローニングと塩基配列の決定  
ヒトゲノム遺伝子 (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー27 (配列番号: 47) およびプライマー28 (配列番号: 48) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は前配ゲノムDNA 1μlを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1μl量、プライマー27 (配列番号: 47) を0.5μM、プライマー28 (配列番号: 48) を0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファァーを5μl加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94℃・1分、95℃・20秒、65℃・30秒、72℃・4分のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃・7分の伸長反応を行った。さらに、該PCR反応産物を鋳型とし、2個のプライマー、プライマーX1 (配列番号: 49) およびプライマーX1 (配列番号: 50) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は前配PCR反応産物 1μlを鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1μl量、プライマーX1 (配列番号: 49) およびプライマーX1 (配列番号: 50) を各0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファァーを5μl加え、50μlの液量とした。PCR反応は、94℃・1分、95℃・20秒、65℃・30秒、72℃・3分のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃・

7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物およびボタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGV-B2 (ニッポンジーン社) を制限酵素KpnI (10U)、XhoI (10U) で37℃、一夜切断処理した。18 アガロースゲル電気泳動し、2.3 Kbp DNA断片 (ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域)、4.8Kbp DNA断片 (pGV-B2) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen社) を用いてDNAを抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域をpGV-B2へサブクローニングした。これを大腸菌DH5αに導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、ヒトSGLTホモログ遺伝子翻訳開始点の2251bp上流から8bp上流領域のDNA配列 (配列番号: 51) を得た。また形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue/pTB2254と命名した。

ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域DNA配列には、Is11, HNF5, PPAR, ENF4などの転写因子の認識結合配列、RNA ポリメラーゼが結合するTATA box が存在した (図13)。

実施例21 SNPを有するヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域の作製

15 Celesta社 SNP データベースを検索すると、ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域に2ヶ所のSNPが見つかった (図13)。C翻訳開始点1564bp上流TをSNP-P1、A翻訳開始点1438bp上流TをSNP-P2と命名した。

20 SNP P1, P2の塩基置換は、pGV-B2-ヒトSGLTホモログ遺伝子上流領域 (pTB2254) DNAにQuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE社) を用いて導入した。pTB2254 10ng、反応buffer 5μl、P1変異導入用プライマー (配列番号: 52) あるいはP2変異導入用プライマー (配列番号: 53) 125ng、dNTP mix 1μl、QuickSolution 3μlに蒸留水を添加して50μlとし、Pfu Turbo DNA Polymerase (2.5U/μl) を1μl添加した。PCR反応は、95℃・1分、95℃・50秒、60℃・50秒、68℃・12分のサイクルを18回繰り返し、最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物に制限酵素 DpnI (10U) を添加し、37℃で1時間反応し、メチル化された親鎖DNAを切断した。これを大腸菌 XL1-Blueに導入し、プラスミドを持つクローンを、アンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析し、P2の塩基置換の入ったDNA配列 (配列番号: 54) を得た。また形質転換体は大腸菌 (Escherichia coli) XL1-Blue /pTB2255



と命名した。P1 の塩基置換の入った DNA 配列 (配列番号: 55) を得た。また形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue /pTB2256 と命名した。P1, P2 両方の塩基置換の入った DNA 配列 (配列番号: 56) を得た。また形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$ /pTB2257 と命名した。

#### 5 実施例 2.2 ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域の欠変異体の作製

ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域 (pTB2254) DNA を鋳型とし、2 個のプライマーセット、プライマー-K2 (配列番号: 57) およびプライマー-X1 (配列番号: 50)、0)、プライマー-K3 (配列番号: 58) およびプライマー-X1 (配列番号: 50)、プライマー-K1 (配列番号: 49) およびプライマー-X2 (配列番号: 59)、プライマー-K2 (配列番号: 57) およびプライマー-X2 (配列番号: 59) を用いて PCR 反応を行った。該反応における反応液の組成は前記 pTB2254 DNA 10ng を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、各プライマーセットを各 0.5  $\mu$ M、dNTPs を 200  $\mu$ M、および酵素に添付のパuffer を 5  $\mu$ l 加え、50  $\mu$ l の液量とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 分、96 $^{\circ}$ C  $\cdot$  20 秒、65 $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒、72 $^{\circ}$ C  $\cdot$  3 分のサイクルを 40 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C  $\cdot$  7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物およびホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGV-B2 (ニッポンジーン社) を制限酵素 KpnI (100)、XhoI (100) で 37 $^{\circ}$ C、一夜切断処理した。18 アガロースゲル電気泳動し、1.3 Kbp DNA 断片 (K2X1)、450 bp DNA 断片 (K3X1)、1.8 Kbp DNA 断片 (K1X2)、0.8 Kbp DNA 断片 (K2X2)、4.8 Kbp DNA 断片 (pGV-B2) を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出し、ライゲーションキット (宝酒造社) の処方に従い、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域を pGV-B2 ヘサブクロニングした。これを大腸菌 DH5  $\alpha$  に導入し、DNA を持つコロニーを、アンピシリンを含む LB 寒天培地中で選択した。個々のコロニーの配列を解析した結果、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域 DNA 配列 K2X1, K3X1, K1X2, K2X2 を得た (図 14)。

#### 実施例 2.3 ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域+レポータープラスミド導入細胞の作製

プロモーターを含まないホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター pGV-B2 (ニッポンジーン社)、SV40 ウィルス初期エンハンサー/プロモーター+

ホタル・ルシフェラーゼ発現プラスミドベクター-pGV-C2 (ニッポンジーン社)、ヒト SGLT ホモログ遺伝子上流領域+レポータープラスミド K1X1 (CA), K1X1 (CT), K1X1 (TA), K1X1 (TT), K2X1, K3X1, K1X2, K2X2 各 0.5  $\mu$ g と内部標準化するためコンントロールとして pRL-TK (単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼプロモーター下流にシーバンジー・ルシフェラーゼを発現する、ニッポンジーン社) 0.5  $\mu$ g と FUGENE 6 (Roche 社) 3  $\mu$ l を Opti-MEM (Gibco-BRL 社) 50  $\mu$ l に添加し 15 分間室温で放置した後、ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞 ( $1 \times 10^4$  細胞/0.2ml 10% PBS 添加 DMEM 培地/48 well plate) に各サンブル 4well ずつ 10  $\mu$ l/well 添加することにより導入処理し、2 日間培養した。

10 プロモーター活性は、ヒッカジンデデュアル・シーバンジー (ニッポンジーン社) を用いて測定した。HepG2 細胞を PBS (200  $\mu$ l) で 2 回洗浄し、添付の細胞溶解剤を各ウェルに 30  $\mu$ l ずつ添加し、室温で 15 分間振とうした。細胞溶解液を各ウェル 10  $\mu$ l ずつ 96 ウェルフルオロブラックプレート (大日本製薬) に移した。ルシフェラーゼによる発光量の測定は、Luminoskan RS (Labsystems 社) を用いた。ホタル・ルシフェラーゼ活性はヒッカジン発光試験 II を各ウェル 50  $\mu$ l ずつ添加し、測定遅延時間 1 秒後、5 秒間発光量を測定した。その後シーバンジー・ルシフェラーゼ活性は、シーバンジー発光試験を各ウェル 50  $\mu$ l ずつ添加し、測定遅延時間 1 秒後、5 秒間発光量を測定した。プロモーター活性は、各ウェルのホタル・ルシフェラーゼ活性のシーバンジー・ルシフェラーゼ活性に対する比率で示した (図 16)。K1K3 領域が、ヒト SGLT ホモログのプロモーター活性に必須であること、K1K3 領域があればさらにプロモーター活性が高まることがわかった。SNP は、CA, CT, TA 型の間ではプロモーター活性に差はないが、TT 型は活性が低下することがわかった。

#### 実施例 2.4 ヒト SGLT ホモログの SNP 解析

26 ヒト SGLT ホモログプロモーター内の SNP をそれぞれ SNP-P1, SNP-P2 とし、構造遺伝子内の SNP を SNP-C1, SNP-C2, SNP-C3 とし、それぞれについて PCR フラグメント直接シーケンス法で配列を確認した。該反応における反応液の組成は、ヒトゲノム DNA (BCP 社) 200ng を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1  $\mu$ l 量、dNTPs を 200  $\mu$ M、および酵素に添付のパuffer

- ア-を5 $\mu$ l 加えた。SNP-P1、P2についてはプライマー29 (配列番号: 60)、およびプライマー30 (配列番号: 61) を各0.5 $\mu$ M 加え、50 $\mu$ l の液量とした。同様に SNP-C1 についてはプライマー32 (配列番号: 63)、およびプライマー33 (配列番号: 64) を、SNP-C2 についてはプライマー35 (配列番号: 66)、およびプライマー36 (配列番号: 67) を、SNP-C3 についてはプライマー38 (配列番号: 69)、およびプライマー39 (配列番号: 70) をそれぞれ使用した。PCR 反応はいずれも94 $^{\circ}$ C・1分の後、96 $^{\circ}$ C・20秒・57 $^{\circ}$ C・30秒・72 $^{\circ}$ C・30秒のサイクルを40回繰り返す。最後に72 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、500bp の DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を30 $\mu$ l 量抽出した。抽出した DNA 5 $\mu$ l に対し、5 $\times$ sequencing buffer (PEバイオシステムズジャパン社) 4 $\mu$ l、BigDye Terminator RR Mix (PEバイオシステムズジャパン社) 4 $\mu$ l を加えた。SNP-P1、P2 についてはプライマー31 (配列番号: 62) を3.2pmol を加え、20 $\mu$ l の液量とした。同様に SNP-C1 についてはプライマー34 (配列番号: 65) を、SNP-C2 についてはプライマー37 (配列番号: 68) を、SNP-C3 についてはプライマー40 (配列番号: 71) をそれぞれ使用した。シーケンス反応は94 $^{\circ}$ C・1分の後、96 $^{\circ}$ C・10秒、50 $^{\circ}$ C・5秒、60 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを25回繰り返す。72 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該反応産物を Sephadex-G50 superfine (アマシャムファルマシア社) で精製した後、100 $^{\circ}$ C・3分処理し、氷冷した。ABI3700 Autosequencer で SNP 部位の塩基配列を決定した。結果を図16に示す。SNP-C2 を除いては健康人58例中においても SNP の発現が確認された。

#### 産業上の利用可能性

- 配列番号: 1、配列番号: 15または配列番号: 26で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質は糖尿病等の診断マーカー等として有用であり、該タンパク質を用いるスクリーニング法により得られる該タンパク質の活性を促進または阻害する化合物は、例えば、糖尿病、高脂血症などの疾病の予防・治療剤として使用することができる。

#### 請求の範囲

1. 配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
2. 配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項1記載のタンパク質またはその塩。
3. 配列番号: 15または配列番号: 26で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。
4. 配列番号: 15または配列番号: 26で表わされるアミノ酸配列を含有する請求項3記載のタンパク質またはその塩。
5. 請求項1記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
6. 請求項3記載のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩。
7. 請求項1記載のタンパク質または請求項5記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
8. 請求項3記載のタンパク質または請求項6記載の部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA。
9. 配列番号: 2で表わされる塩基配列を有する請求項7記載のDNA。
10. 配列番号: 7で表わされる塩基配列を有する請求項7記載のDNA。
11. 配列番号: 16または配列番号: 27で表わされる塩基配列を有する請求項8記載のDNA。
12. 請求項7記載のDNAを含有する組換えベクター。
13. 請求項8記載のDNAを含有する組換えベクター。
14. 請求項12記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
15. 請求項13記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
16. 請求項14記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のタンパク質または請求項5記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項1記載のタンパク質もしくは請求項5記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。
17. 請求項15記載の形質転換体を培養し、請求項3記載のタンパク質または請求項6記載の部分ペプチドを生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする

請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造法。

1 8. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

5 1 9. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬。

2 0. 請求項 7 記載の DNA を含有してなる医薬。

2 1. 請求項 8 記載の DNA を含有してなる医薬。

2 2. 請求項 1 または請求項 3 記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドもしくは請求項 5 または請求項 6 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを含有することを特徴とする診断剤。

2 3. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

15 2 4. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。

2 5. 請求項 2 3 または請求項 2 4 記載の抗体を含有することを特徴とする診断剤。

2 6. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする。請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のス

20 クリーニング方法。

2 7. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする。請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のス

25 クリーニング方法。

2 8. 請求項 7 または請求項 8 記載の DNA のプロモーター下流にレポーター遺伝子を挿入した DNA を含有する組換えベクターで形質転換させた形質転換体を用いることを特徴とする。請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質または請求項 5 もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドの発現を促進または抑制する化合物また

はその塩のスクリーニング方法。

2 9. 請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる。請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニ

5 グ用キット。

3 0. 請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる。請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニ

10 グ用キット。

3 1. 請求項 2 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2 9 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

3 2. 請求項 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 0 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

15 3 3. 請求項 2 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2 9 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

3 4. 請求項 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 0 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

20 3 5. 請求項 2 6 記載のスクリーニング方法または請求項 2 9 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 1 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる

25 医薬。

3 6. 請求項 2 7 記載のスクリーニング方法または請求項 3 0 記載のスクリーニグ用キットを用いて得られる。請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 6 記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる

医薬。

3 7. 請求項2 6記載のスクリーニング方法または請求項2 9記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項1記載のタンパク質もしくは請求項5記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

5 3 8. 請求項2 7記載のスクリーニング方法または請求項3 0記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求項3記載のタンパク質もしくは請求項6記載の部分ペプチドまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる医薬。

3 9. 糖尿病の予防・治療剤である請求項1 8または請求項2 0記載の医薬。

10 4 0. 糖尿病の予防・治療剤である請求項1 9または請求項2 1記載の医薬。

4 1. 糖尿病の予防・治療剤である請求項3 5記載の医薬。

4 2. 糖尿病の予防・治療剤である請求項3 6記載の医薬。

4 3. 高脂血症の予防・治療剤である請求項3 7記載の医薬。

4 4. 高脂血症の予防・治療剤である請求項3 8記載の医薬。

15 4 5. 糖尿病・高脂血症の診断剤である請求項2 2または請求項2 5記載の診断剤。

4 6. 請求項1もしくは請求項3記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドまたは請求項5もしくは請求項6記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドを用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法。

20 4 7. 請求項2 3または請求項2 4記載の抗体を用いることを特徴とする糖尿病・高脂血症の診断方法。

4 8. 哺乳動物に対して、請求項3 1または請求項3 2記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする糖尿病の予防・治療方法。

4 9. 哺乳動物に対して、請求項3 3または請求項3 4記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする高脂血症の予防・治療方法。

25 5 0. 糖尿病の予防・治療剤を製造するための請求項3 1または請求項3 2記載の化合物またはその塩の使用。

5 1. 高脂血症の予防・治療剤を製造するための請求項3 3または請求項3 4記載の化合物またはその塩の使用。

5 2. 配列番号：2、配列番号：1 6または配列番号：2 7で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型 (SNPs) 体。

5 3. 配列番号：4 0、配列番号：4 2または配列番号：4 5の何れかで表される塩基配列を含有する請求項5 2記載の一塩基多型 (SNPs) 体。

5 5 4. 請求項5 2記載の一塩基多型 (SNPs) 体にコードされるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

5 5. 配列番号：4 1、配列番号：4 3または配列番号：4 6の何れかで表されるアミノ酸配列を含有する請求項5 4記載のタンパク質またはその塩。

5 6. 配列番号：5 1で表される塩基配列を含有するDNA。

10 5 7. 配列番号：5 1で表される塩基配列を含有するDNAの一塩基多型 (SNPs) 体。

5 8. 配列番号：5 4、配列番号：5 5または配列番号：5 6の何れかで表される塩基配列を含有する請求項5 7記載の一塩基多型 (SNPs) 体。

5 9. 請求項5 2記載の一塩基多型 (SNPs) 体を含有する組換えベクター。

15 6 0. 請求項5 6記載のDNAまたは請求項5 7記載の一塩基多型 (SNPs) 体を含有する組換えベクター。

6 1. 請求項5 9記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

6 2. 請求項6 0記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

6 3. 請求項6 1記載の形質転換体を培養し、請求項5 4記載のタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする請求項5 4記載のタンパク質またはその塩の製造法。

6 4. 請求項5 2記載の一塩基多型 (SNPs) 体を含有してなる医薬。

6 5. 請求項5 4記載のタンパク質またはその塩を含有してなる医薬。

6 6. 糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である請求項6 4または請求項6 5記載の医薬。

6 7. 請求項5 2または請求項5 7記載の一塩基多型 (SNPs) 体を含有してなる診断剤。

6 8. さらに、配列番号：2、配列番号：1 6、配列番号：2 7または配列番号：5 1で表される塩基配列を含有するDNAまたはその一部を含有する請求項6 7

記載の診断剤。

69. 糖尿病または高脂血症の診断剤である請求項67記載の診断剤。

70. 請求項52または請求項57記載の一塩基多型 (SNPs) 体を解析することとを特徴とする糖尿病または高脂血症の診断方法。

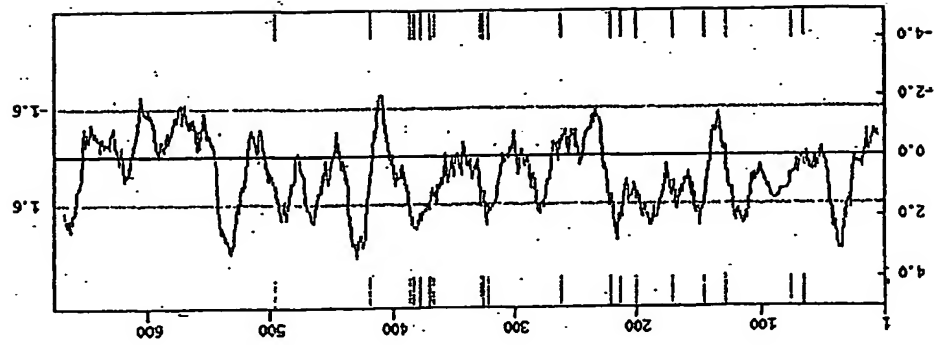
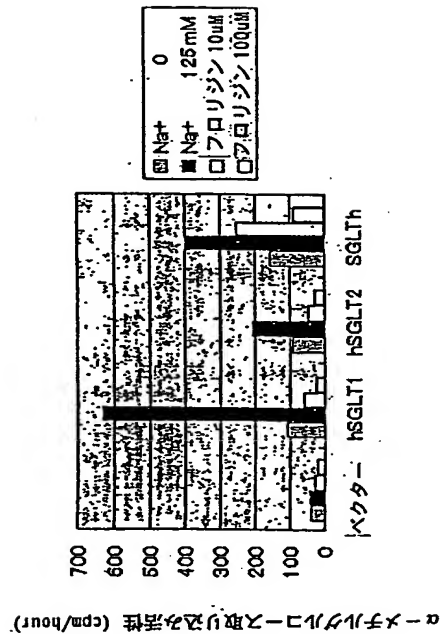
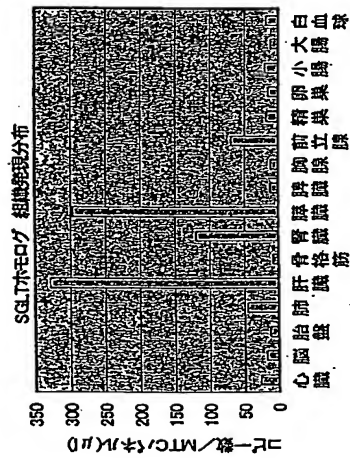


図 1



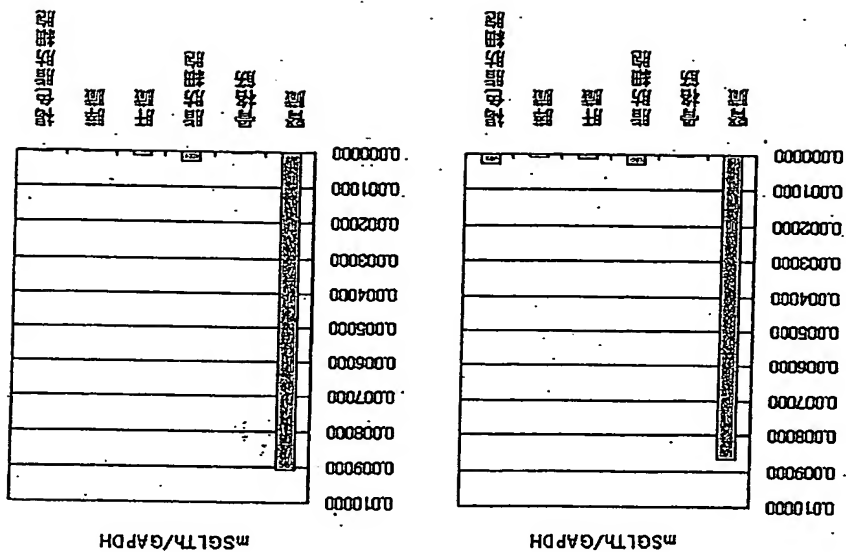


図 5

差替元用紙 (規則26)

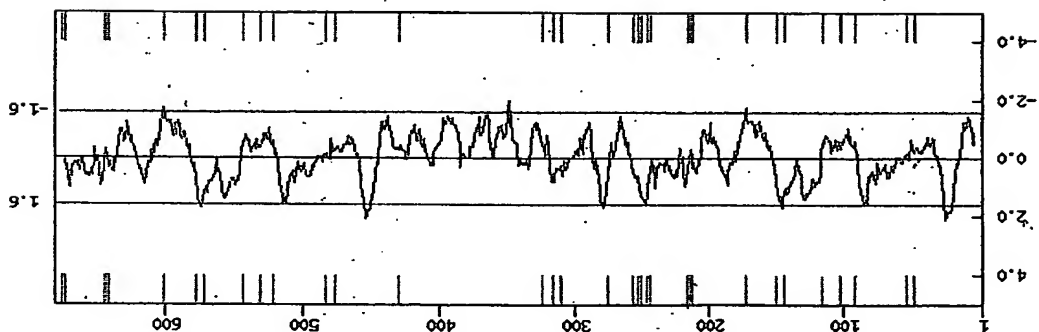


図 4

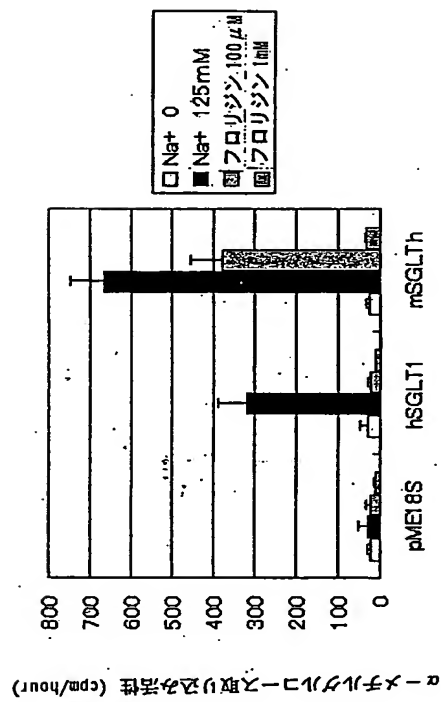
差替元用紙 (規則26)

BEST AVAILABLE COPY



6/16

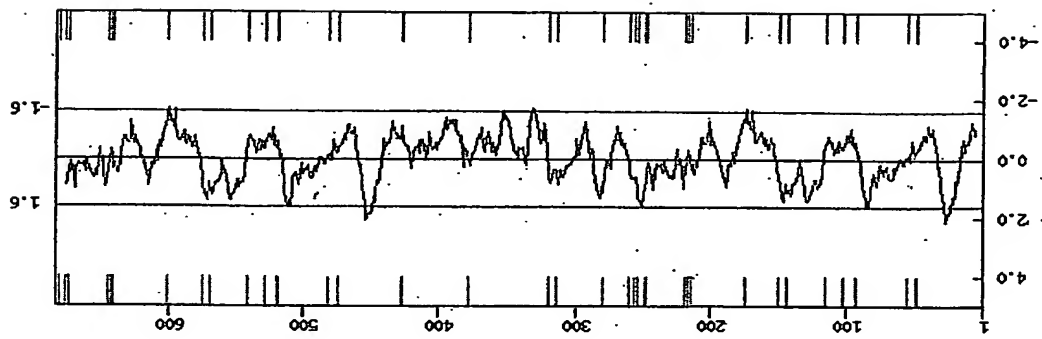
図 6



差替え用紙 (規則26)

7/16

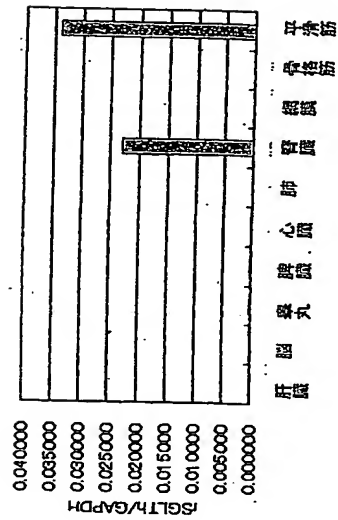
図 7



差替え用紙 (規則26)

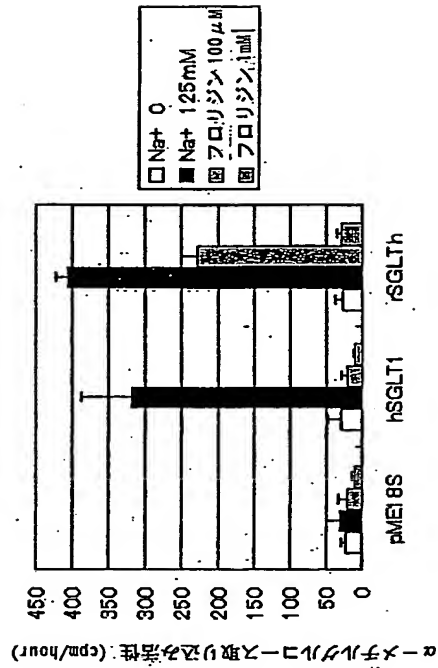
8/16

図 8



9/16

図 9

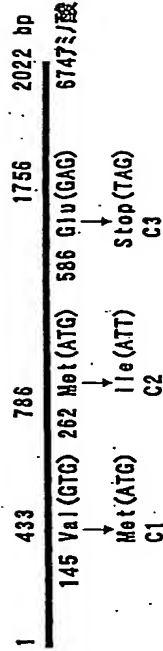
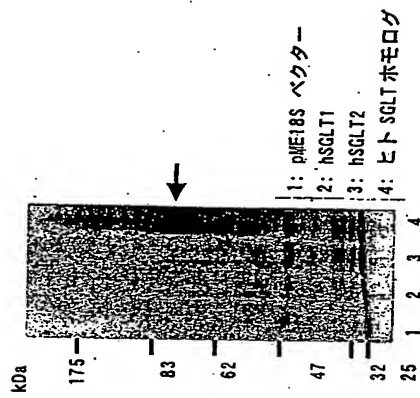


11/16

10/16

図 11

図 10



13/16

14/16

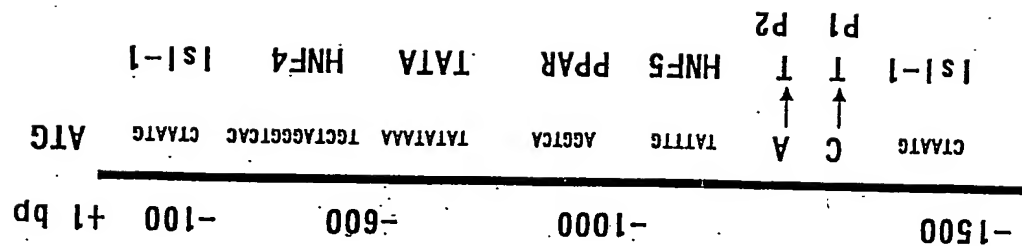


図 13

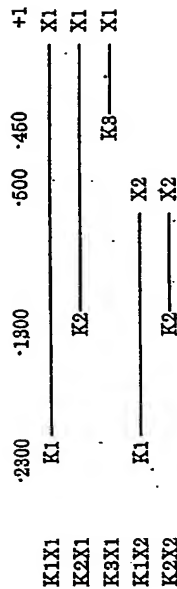
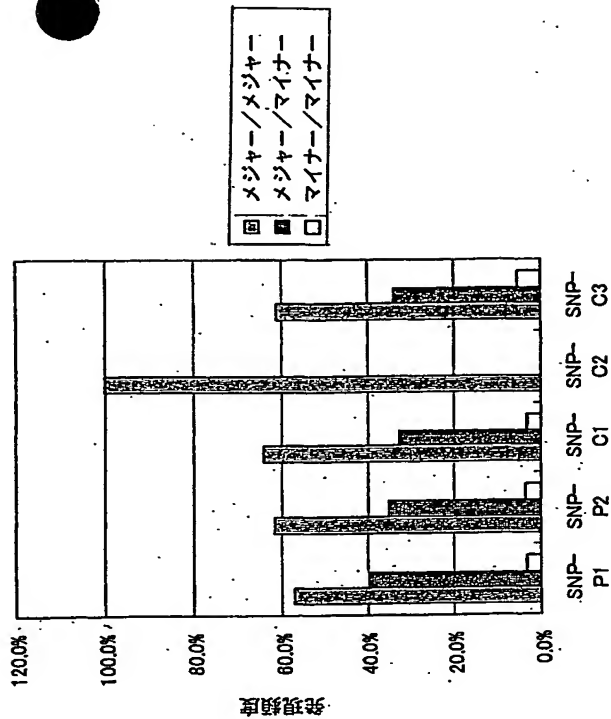


図 14

16/16

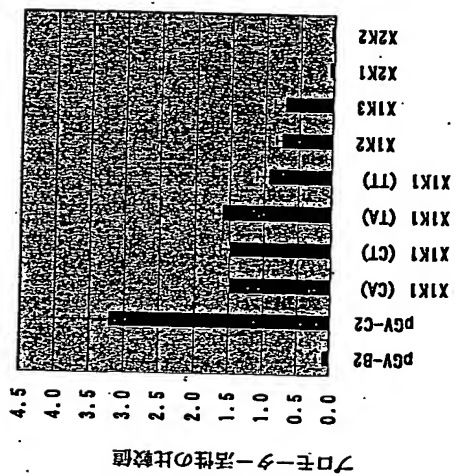
図 16



発替え用紙 (規則26)

15/16

図 15



発替え用紙 (規則26)

1/50

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Takeda Chemical Industries, Ltd.

&lt;120&gt; Novel Protein and Its DNA

&lt;130&gt; 2847W00P

5 &lt;150&gt; JP 2000-403078

&lt;151&gt; 2000-12-28

&lt;150&gt; JP 2001-195467

&lt;151&gt; 2001-06-27

&lt;160&gt; 71

10 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 674

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

15 Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5

10

15

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

20

25

30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

35

40

45

Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

50

55

60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65

70

75

80

25 Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly

85

90

95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu

100

105

110

Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val

2/50

115

120

125

Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln

130

135

140

Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile

6

145

150

155

160

Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly

165

170

175

Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val

180

185

190

10 Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu

195

200

205

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly

210

215

220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln

15

225

230

235

240

Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245

250

255

Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro

260

265

270

20 Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp

275

280

285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu

290

295

300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu

305

310

315

320

Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

325

330

335

Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340

345

350

3/50

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met

355

360

365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met

370

375

380

5 Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr

385

390

395

400

Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu

405

410

415

Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Phe Leu Val Val

10

420

425

430

Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln

435

440

445

Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile

450

455

460

15 Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro

465

470

475

480

Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg

485

490

495

Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp

20

500

505

510

Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile

515

520

525

Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys

530

535

540

25 Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr

545

550

555

560

Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr

565

570

575

Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly

4/50

Ala Ala Glu Asn Ser Ser Leu Gly Gln Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser

580

585

590

Arg Ser Trp Gly Lys Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly

595

600

605

5 Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Ala Leu Glu Gln

610

615

620

625 Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn

630

635

640

10 Ile Asn Ala Val Leu Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr

645

650

655

Phe Ala

674

660

665

670

&lt;210&gt; 2

15 &lt;211&gt; 2022

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

atggggcctg gagcttcagg agacgggic aggaataga cagctccaca catagcacig 60

20 gactccagag ttggtctgca cgcctacgac atcagcgtag gggtatctia ctttgtctic 120

gtcattgctg tggggatctg gtcgtccalc cgtgcaagtc gaggagaccat tggcggctat 180

ttccggccg agagggtccat gagcgttagg ccaattggag catctcgtat gttccagcaat 240

gtgggcagtg gctttgtcat cggcctggct gggacagggg ctgccggagg ccttgcgcta 300

gggtgcttgc agtggagcgc aacclggcig ctccggccc ttggcigggt ctttgtccct 360

25 ggtacatgc cagcaggigt ggtcacaatg ccgcagatc tgaagaagcg atttgggggc 420

cagagagacc aggtgtacat gtctgtccig tctctatcc tctacatctt caccagatc 480

tcgactgaca tcttctcigg agccctcttc atccagatgg catttgggcig gaacctgtac 540

ctctccacag ggaatctgct ggltgtgact gccgtctaca acattgcagg tggcctcatg 600

ggcgtgatct acacagatgc tctgcagacg gtgatcatgg tagggggagc ccttgtcttc 660



5/50

6/50

atgtttctgg gctttcagga cgtggcctgg taccaggcc tgagcagcg gtacagcag 720  
gcatccctta atgtacagt ccccaacac acctgtcacc tccacggcc cgaatgtttc 780  
caaatgtctt ggagcccttgt gagcgggagc atcccttggc caggtctcat tttagggctc 840  
acagtgtcgg ccacctgggtg ttgtgtcaca gaccaggtca ttgtgcagcg gtctctctcg 900  
5 gcaagagtc tgtctcagc caagggagggc tccgtgtcgg ggsgctacct gaagatcttc 960  
cccatgtctt tcatgtctat gccctggcatg atcagccggg cctgtlccc agacggagtg 1020  
ggctgtcgtgg accctgaigt ctgccaaga atctgtgggg cccgagtggg atgtttcaac 1080  
atgtccatcc ctatgttggt catggccctc atgctgttg gtctgcgggg gctgagatt 1140  
gctgtatca tggcgcctct catgagctca ctacacctca tcttcaacag cagcagacc 1200  
10 cgtttacca ttgattgttg gcagccttc cgcaggaggt caacagagca ggagcigtatg 1260  
gtggtaggca gagtgtttgt ggtgttcttg gtltgtatca gcatctcttg gatccctatc 1320  
atccaaagt ccaacagtg gcagccttc gactatccc aggcgtctac cagttaccctg 1380  
gcccaccca tcaacgtct ctctctgttg gccatcttct gcaagagggt caccagagcc 1440  
ggagctttct ggagccctctgt gtttggccctg gagtgggcg ttctggtat gatcttgag 1500  
15 ttctatacc cagcgcagc cttgtgggag gtgaccgga ggccagcagt gctgaaggac 1560  
ttccatacc tgaatttgc aatctctctc tgcgggtca ctgcacatgt catgttcatt 1620  
gtacagctct gtacacccc catctctgag gaacagctca cagctctac atgttgagct 1680  
cgggaactgc cctctctga gctggagaag gaggccacag agagcacacc ggaatatacc 1740  
gagagggccag caggggagtg ccttgcagga ggtggagcgg cagaagacac aggcctgggc 1800  
20 caggagcagc ctgaagccc aagcaggctc tggggaagt tgccttgag ctagcttctat 1860  
gggctctctg gaacacaggc gcaagccctg agccagcag agaaggctgc gctagaacag 1920  
aagctgaca gcatlgagga ggagccctc tggagacatg tctgaacat caatgtctc 1980  
cttttgcagg ccatcaaat ctctcttgg ggtatatttg cg 2022

&lt;210&gt; 3

25

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

26

&lt;400&gt; 6

tctactagtt cagcgaat agccccaga 29

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 3140

&lt;212&gt; DNA

<400> 3  
ctaacagaga gcaaggagct ggc 23

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

10 aggtctgtgg aatcacgaa 20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

15 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 5

tgaaattcat ggggcttggg gctt 24

&lt;210&gt; 6

20 &lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

7/50

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 7

atggggcttg gggcttcagg ggggggggtc aggc tggc cagctccaca catagcactg 60  
gactccagag ttggctcggc cggctacgac atcagcggagg tggctatcta ctttgtcttc 120  
5 gtcattgtcg tggggatcgtg gtgcgccatc cgtgcaggtc gggggacatc tggcggtat 180  
ttctggccg ggaagctccat gagg tgg tgg ccaat tggag catctctgat gtccagcaat 240  
gtgggcagtg gcttggtcat cggcttgct ggggacagggg cggcggaagg ccttgccgta 300  
ggggcttcg agtggacgc aactggctg ctcctggccc ttggctgggt cttgcctct 360  
gtgatacag cagcaggtgt ggtacaaatg ccgcagatc tgaagaagg atttggggc 420  
10 cagaagatcc aggtgatc gtctgtcgtg tctctcatc tctatctt caccagatc 480  
tcagatgaca tctctctgg agcccttc atccagatgg catgggcgtg gaaccgtatc 540  
ctctccacg ggaatctgt ggtggtaact gcgtcttaca ccatggcagg tggcctcatg 600  
gcggatct acacagatgc tctgcagcg gtgatcatgg tagggggagc ccggctctc 660  
atgtcttgg gctttcagga cgtggcctgg taccagccc tggagcagcg gtacaggcag 720  
15 gcatcctcta atgtcacat, ccccaaac accgtgcacc tccacggcc cgaatcttc 780  
cacatgttc gggaccctgt gaggggggac atcccttggc caggctcatc ttccggctc 840  
acagtgctgg ccacttgggt ttggtagca gaccaggtca ttgtgcagcg gtctctcgt 900  
gccaagagtc tgtctcatgc caggggaggg tccgtgtcgg ggggctacct gaagatctc 960  
ccatgttct tcatgtcat gctggcatg atcagccggg cctgtccc agcagagtg 1020  
20 ggcgtcgttg accctaatgt ctgcaaga atctgtgggg cccag'tggg atgttcaac 1080  
atggctacc ctgaagtgtt calggcctc atgcctgttg gtctgcgggg gcgatgatt 1140  
gcgtgatca tggcgctct calgatgca ctacctcca tcttcaacag cagcagccc 1200  
ctgttacc a ttgtgtgtg gtagcgttc ccagggaggt caacagagca gggcgtatg 1260  
gtgggggca gagg'tttgt ggtgtctcg gtgttcatca gcatctctcg gatcccatc 1320  
25 atccaaagct ccaacagatgg gtagcgttc gactacatcc aggcgttacc cagtaccg 1380  
gccccacca tcaacgctct cttctgtcg gccatctct gcaagaggggt cagagagccc 1440  
ggagcttctt gggggctcgt gtttggctg ggggttggggc ttctgctat gatctggag 1500  
ttctatacc cagggcagc cgtggggag gtggaccgga gggcagcag gtctgaaggac 1560  
ttccatacc tctacttgg aatctctc tgggggca ctgcatctc cattgtcatt 1620

8/50

gtcagcctt gtacacctc catccctgag gaacagctca cagccctcac atgg'tggact 1680  
cggactgcc cctctctga gctggagaag gaggccacag agagcacacc ggaatatcc 1740  
gagggcagc cgggggagtg ccttgcagga ggtggagcgg cagagaactc gaggctgggc 1800  
caggagcagc ctgaagcccc aagcagg'tcc tggggaagt tgcctggag ctgttctgt 1860  
5 gggctctctg gaacacgga gcaggccctg agcccgagcag aagaagctgc ctagaagcag 1920  
aagctgacaa gcatggagga gggagccatc tggagacatg tctgcacat caatgtctg 1980  
cttttggc ccatcaatc ctctcttgg ggttatcttg cgt'altcca cagacc'tggc 2040  
ttcaggttag acagattaaa caaagcccaa gccgtgcagc cacagaaaca ggcctcttc 2100  
ttacttgtc gtctaaactg ggaatcacag aag'tcaagac tgaagctcc cctgaagaga 2160  
10 atcccaacta acc'tgcacac ttgacaagt'g gagaacaga agctcagaga gaggcactggg 2220  
tttgg'tcagg accaccgaa aggtgtcaca cgggg'ttcc ccactcttc tgaatatg 2280  
cctt'acagac ctactcaaa cacactgttt ccacccttt ctgaa'tgta ttcag'tagcc 2340  
tttactgaat gtgtgtcttg agat'agaaa aatggaggat acaaagaaaag gaggcaggaag 2400  
aaat'tgcaa aaatccaaaga gcaacttgc tccccctat cctctctct ctcccc'ttt 2460  
15 ctagt'tccc tacc'tctca tcttctatt ctccaata atctctt'gt tgcattgaatt 2520  
taccaggag agtctatatt ttcat'tgtt ggtctcacag tgg'tggcgt cagacc'cgaa 2580  
gggg'tgggga gccaggg'tg gact'taagc atgg'tgacag atgg'tatttt gggcgagaag 2640  
ctcttgaca atggcctatc caagcacta tttaa'tct gctcttctt ac'tctaac 2700  
ccaaat'atgc acaactctc tatggccttg agaagcag'tt ggaagacat gact'tgtaa 2760  
20 aacctcaagg aatcagaca tgttactctg tat'taaggg taagccccc agcggggcagc 2820  
acaaacagcc tggggagccac tgt'gctgtg ctctctgtc ctctctctt tgc'ttgcct 2880  
gaatccgat act'ttggat acactgtgac cccag'ttaag tgcctcttg ccaggagct 2940  
ggcgaaagt cagagcttgg g'tcaagt'ccc cactctgtc ccatagcct tgaactgtct 3000  
ctgtcacagc actgataca ctgaat'gga agactccagg gggcagagac caagggcctat 3060  
25 atcccaag'tg act'ttgiacc cagaaataa cagctgtca ataatgtgt at'gag'ttaa 3120  
aaaaaaaaa aaaaaaaaa  
<210> 8  
<211> 22  
<212> DNA

9/50

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 8

5 ggctcgggg ggcgatgat tg 22

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 9

aggctggcgc tgggtatgag aac 23

&lt;210&gt; 10

15 &lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

20 &lt;400&gt; 10

cccgatgctt tccacattct tc 22

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 11

acaatgacct ggctcgtgca cc 22

10/50

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 12

acatcccttg gccaggcttc atttcgg 28

&lt;210&gt; 13

10 &lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

15 &lt;400&gt; 13

ggggggcaga ggaiccagggt gta 23

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 14

gcaatcaica gcccccgcag ac 22

25 &lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 678

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 15

11/50

Met Glu Pro Gly Val Ser Arg Asn Gly Val Arg Thr Glu Thr Thr Thr

5  
Asn Pro Ser Leu Gly Leu His Thr Tyr-Asp Ile Val Val Val Ile

20  
Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser Ile Arg Ala

35  
Ser Arg Gly Thr Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg Ser Met Thr

50  
Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val Gly Ser Gly

65  
Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Leu Ala Val

85  
Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala Leu Gly Trp

100  
Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr Met Pro Gln

115  
Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val Tyr Met Ser

130  
Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser Thr Asp Ile

145  
Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp Asn Leu Tyr

165  
Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr Thr Ile Ala

180  
Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln Thr Val Ile

195  
Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe Gln Glu Val

210  
Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ala Ile Pro Asn

12/50

225  
Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Pro Asp Ala Phe

245  
His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Leu

260  
Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys Thr Asp Gln

275  
Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser His Ala Lys

290  
Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro Met Phe Phe

305  
Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro Asp Glu Val

325  
Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly Ala Arg Val

340  
Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala Leu Met Pro

355  
Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala Ala Leu Met

370  
Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu Phe Ala Ile

385  
Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln Glu Leu Met

405  
Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Val Ile Ser Ile Leu

420  
Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu Phe Asp Tyr

435  
Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr Ala Leu Phe

455  
460

13/50

14/50

Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Asn Glu Pro Gly Ala Phe Trp  
465 470 475 480  
Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met Ile Leu Glu  
485 490 495

5 Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Met Asp Arg Arg Pro Ala  
500 505 510

Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu Cys Gly  
515 520 525

Leu Thr Ala Ile Ile Val Val Ile Ser Phe Thr Glu Pro Ile  
530 535 540

Pro Asp Asp Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Thr Arg Asn Cys Ala  
545 550 555 560

Val Ser Asp Leu Gln Lys Lys Thr Ser Val Ser Val Asn Asn Thr Glu  
565 570 575

15 Asp Asp Asn Ser Pro Gly Leu Ala Gly Arg Pro Val Val Glu Gly Pro  
580 585 590

Ala Gly Asp Glu Glu Glu Ala Asn Thr Thr Gln Gly Pro Glu Gln Pro  
595 600 605

Gly Ala Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn Trp Phe Cys  
610 615 620

Gly Leu Ser Gly Ala Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala  
625 630 635 640

Val Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg  
645 650 655

25 Arg Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe  
660 665 670

Leu Trp Gly Tyr Phe Ala  
675 678

&lt;210&gt; 16

<211> 2034  
<212> DNA  
<213> Mouse  
<400> 16

5 atgaacacag gagtgtaag gaatggagtc agaacigaga caacaacga ccaacgccig 60  
gggtacata cctatgacat cgttggtgtg gtcattatit ttgtctttgt tcttgctgtg 120  
ggaatttggc catcctacgc tgaagtoga gggaccgttg gtggctattt cctggc1ggg 180  
agatccaiga cctggctggc aattggagca tctctaatgt ccagcaatgt gggcag1ggc 240  
ttatttatcg gcttggtc1gg aacagggcct gctggaggac ttgc1gt1gg tggcttt1gag 300  
tgggaagcaa ccttcc1gct tctagccc1g ggc1ggatct ttgtccct1g gtacatagca 360  
gctgg1ggg tcaacatgcc acagtacctg aagaacgat ttgggggaca gaggatccag 420  
gtgtacatgt cagttctt1c tctatcttc tcatcttca ccaagat1c gac1gat1c 480  
ttct1ggag cctct1ctat ccagatggcc ttgggt1gga atctctatct ctccacagtc 540  
atct1gct1gg tgg1gacagc tgc1ctaccc at1gcagagg gct1c1cagc tgl1gat1c1ac 600  
acagatgctc tacagactgt gatc1gg1t gggggagctc tgg1cct1cat gtt1ct1ggc 660  
tttcagagg ttggct1gga cccagccc1g cagcagctct atagacaggc catccccaat 720  
accacag1c ccaataccac ctgtcacc1c ccacggcct1g atgct1c1ca catgct1gga 780  
gattct1gga atggagacat ccc1gggcca ggtctctatt ttggcct1cag agct1t1ggc 840  
acc1gg1gt1 ggt1gacaga ccagg1gat1 gtgcagagg1 ctctcgcagc caagaatctt 900  
tcacatggcca agggaggctc cgt1gctagg1 ggc1ctactaa agatcc1ccc aatgt1ct1c 960  
at1gtc1gc ctggc1gat1 cagcaggccc ctgtacc1cag atgaagt1gc ctgt1ggac 1020  
cctgacatct gtcaaaagt1 gt1ggggccc agag1ggat gctccaat1 tgcct1acccc 1080  
aag1tg1t1a tggct1ctat gcc1gt1gggg ctgcaggccc tga1gat1gc tgl1gat1c1g 1140  
gct1gcct1ca tga1ctcact cactct1atc ttcaacagca gt1agcactct gtt1ggc1ata 1200  
gat1gt1ggc agcct1c1cg cagcag1c1a tgggagcaag agc1gat1gt1 ggt1aggcagg 1260  
ttgtct1gag tcttcc1ggt ag1catcagc atcc1ct1gga tccc1cat1 ccagagct1cc 1320  
aat1ag1gggc agctct1t1ga ctacatccaa tctatc1c1ca gct1act1agc ccc1cc1c1c 1380  
acagccctct tct1gct1ggc tatct1ct1gc aagagg1t1ca acgagcct1gg tgcct1ct1gg 1440  
ggctctatgt ttggcct1ggt cgt1cagaa1a ct1cgg1atga tct1ggag1t ct1cat1c1g 1500

16/50

16/50

gccccagcct gggggagat ggaagcgg ccagctgtc tgaagactt ccactiaccg 1560  
tacttggcc ttctctctg tggactgacc ggcatacga ttgtgtaat cagcttcttc 1620  
acggagccca tccccgaiga caagcttgc tccctgacct ggtagacaag gaactigccc 1680  
gtatcgacc tgcagaaga aacctctgt agttagaca acacagagga tgacaactct 1740  
5 ccaggactgg caggagagcc agtggtagag gcccctgcag gagaagaga agaagcaaac 1800  
accactcagg gcccagaaca accagagccc ctacacaggt cctggggaaa atggctgtgg 1860  
aacctgtctt gggactctc agggagccca cagaagccc tggcccccag tgagaaggct 1920  
ggttggagc agaagctgac cagcatcag gagagccgc tctgagacg tctctgcaac 1980  
ataaagcca tcatctcgt agcatcaac atcttctctt gggcctattt tgcg 2034

10 &lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

15 &lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 17

atggaaccag gagtgcag gaa

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 18

ggagtgcgaa aatagcccca gag

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>  
<223> Primer

&lt;400&gt; 19

cggaattcat ggaaccagga ggtcgaag

5

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 20

tctactagtt cagcaaat agccccaga

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 21

15 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 21

20 tgcacagacc aggatgtg g

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 22

gcacagacc tcccttg

&lt;210&gt; 23

17

21

29

17/50

<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

5 &lt;223&gt; Primer

<400> 23  
ctcgcagcca acaatcttcc aacatg

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 22

10 &lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence  
<220>

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 24

15 atctctaag tccagcaatg tg

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

20 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 25

accagcttgg ggtaggcaat

&lt;210&gt; 26

25 &lt;211&gt; 681

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rat

&lt;400&gt; 26

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

18/50

5 10 15  
Gln Ala Leu Gly Ser Gly Val Ser Leu His Thr Tyr Asp Ile Val Val  
20 25 30

Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser  
35 40 45

Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg  
50 55 60

Ser Met Thr Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val  
65 70 75 80

10 Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly  
85 90 95

Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala  
100 105 110

Leu Gly Trp Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr  
115 120 125

Met Pro Gln Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val  
130 135 140

Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser  
145 150 155 160

20 Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp  
165 170 175

Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr  
180 185 190

Thr Ile Ala Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln  
195 200 205

Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe  
210 215 220

Arg Glu Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ser  
225 230 235 240



19/50

Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Ser

245

250

255

Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp

260

265

270

5 Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys

275

280

285

Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu Ser

290

295

300

His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro

10

305

310

315

320

Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro

325

330

335

Asp Glu Val Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly

340

345

350

15 Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala

355

360

365

Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala

370

375

380

Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu

20

385

390

395

400

Phe Ala Ile Asp Val Trp Gln Arg Val Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln

405

410

415

Glu Leu Met Val Val Gly Arg Leu Phe Val Phe Leu Val Leu Ile

420

425

430

25 Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu

435

440

445

Phe Asp Tyr Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr

450

455

460

Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro Gly

20/50

465 470 475 480

Ala Phe Trp Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met

485

490

495

Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Lys Asp Arg

5

500

505

510

Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu

515

520

525

Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Ile Val Ile Ile Ser Phe Phe Thr

530

535

540

10 Glu Pro Ile Pro Asp Glu Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Thr Arg

545

550

555

560

Ser Cys Pro Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Val Ser Val Ser Val Asn

565

570

575

Asn Thr Glu Ser Asp Asn Ser Pro Ala Leu Ala Gly Arg Pro Val Met

15

580

585

590

Glu Gly Thr Ala Gly Asp Glu Glu Ala Asn Thr Thr Ser Glu Pro

595

600

605

Glu Gln Pro Glu Val Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn

610

615

620

20 Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly Thr Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala

625

630

635

640

Glu Lys Ala Glu Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro

645

650

655

Leu Trp Arg Cys Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile

25

660

665

670

Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr Phe Ala

675

680

681

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 2043

21/50

22/50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 27

atgaacacg gagcttcaag ggaaggactc agagctgaga caacacacca agcccaggcc 60  
5 tcggagagica gccctgcacac ctatgacalc ctatgacalc ggggtggggg tcatctatct tgccttggc 120  
cttgcctggg gaattgggc gtcattccgc gcaagccgag ggaacattgg tggctatttc 180  
ctggctggaa gatccaatgac ctggggccca atggagacat cictaaagtc cagaatctg 240  
ggcag'tggct tatcatatcgg cctggctggg acagggggc'tg ctggagggcct tgc'tgggg't 300  
ggcttcaggt ggaatgcaac ttttctgctt ctggccctgg gctggatctt tgcctctg 360  
10 tacatgcag ctggatggat caccatggca cagtaacctga agaaacgatt tggggggcag 420  
agatccagg tctacatgic agtccctgct ctcatatct acatcttcac caagatatg 480  
actgatct tctctggagc cctcttcac cagatggct tgggctggaa tctctatctc 540  
tcacagtica tccctggatg ggtgacagct gctacacca ttggaggggg cctcacagct 600  
gtatctaca cagatgctct acagaccctg atcatgg'ttg ggggagccct ggctctcatg 660  
15 tttctgggct ttggggaggt cggctgg'tac ccaggctgc agcagcticta tagacag'tcc 720  
atcccacag tcacag'ttcc caactatcc tgcacctcc cagcgtctga tgccttccac 780  
atgcttcag atcctg'tga cgggacalc cctggccag gctctatttt tggccctaca 840  
gtcttggcca cctgg'tg'tg g'tgcacggac caggtgat'tg tgcagaggtc tctctggcc 900  
aagagctt'tt cacatgccaa gggagagatca g'tgttgggg gctaccctaaa gatctccca 960  
20 atgtcttca ttgtcatgcc cggcatgatc agcagggccc tglaccaga tgaagtcgcc 1020  
tgttggacc ctgacatctg tcagagag'tg tctggggcca ggttggatg ctccatatt 1080  
gccctacca aacttg'tat ggcctc'cag ccttggg'tc tgcagggcct gatgatgcc 1140  
gtatcatgg ctggccctcat gagctc'alc accctcatct tcaacagcag tagcaccctg 1200  
tttggcatag atgtgtggca g'cag'tccgc aggcaggcat cggagcaaga gctgatgg'tg 1260  
25 gtaggcaggt tgtttg'tat ctctctg'ta ctcatcgca tctctggat ccccatctc 1320  
cagagctcca atagtgggca gctcttg'ac tacatccaat ccatcaccag ctaccatgcc 1380  
ccgccatca cagccctctt cctgc'tggcc atcttc'gca agagggtcac tgaagctggt 1440  
ggcttc'ggg ggcctatg'tt tggcttgg'ta g'tgggaatc tgcgtatgat tctggag'tc 1500  
tcalactcag cccagcct'g tgggagagag gacagggcgc cagctgttct taaggacttc 1560

cactaccigt acttggccct cctctctctg't ggacttaccg ccatcatcat tgcataatc 1620  
agcttcttca cggagcccat ccccgacgaa agcttgc'tc gcttgacc'tg g'tggacaagg 1680  
agctgtccca tatctgaact acagagaana g'tc'tc'g'tga g'tgtgaacaa cacagagagt 1740  
gacaacttc cagcactggc agggagggcca g'tgatggagg g'cactgcagg agatgaggaa 1800  
5 ggaagaacaa ccccttcaga gcc'tgaacaa ccagaag'tcc tacacaggtc ctgggggaaa 1860  
tggcttggga acttgg'ttctg cggactctct ggaacaccac agcagcact gaggccagct 1920  
gagaaggctg agcttggagca gaagctgacc agcatcgagg aagagccact ctggagatgt 1980  
gtctgaaca tcaatggcat catctctg'tg gccatcaaca tcttctct'g gggctatttt 2040  
ggc 2043

10 &lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;230&gt;

15 &lt;232&gt; Primer

&lt;400&gt; 28

caatgggaacc tggagcttca ag

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;230&gt;

&lt;232&gt; Primer

&lt;400&gt; 29

25 tgaagcaaaa tagccccaga gaag

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

23/50

24/50

<220>  
<223> Primer  
<400> 30  
cgaattcat ggaacclgga gcttc  
5 <210> 31  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
10 <223> Primer  
<400> 31  
tctactagtt cagcacaat agccccaga  
<210> 32  
<211> 20  
15 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 32  
20 ctacacagctc tggccaccig  
<210> 33  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
25 <220>  
<223> Primer  
<400> 33  
agaacggcct ctcctcggag  
<210> 34

<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
5 <223> Primer  
<400> 34  
tgcacggacc aggtgatgtt gc  
<210> 35  
<211> 22  
10 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 35  
15 tctggagatca gctgcacac ct  
<210> 36  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
20 <220>  
<223> Primer  
<400> 36  
cagccttctc agctgggctc ag  
<210> 37  
25 <211> 16  
<212> PRT  
<213> Human  
<400> 37

His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Cys

25/50

26/50

5

10

15

$\langle 210 \rangle$  38

 $\langle 211 \rangle$ . 25

**<212> DNA**

## 5 <213> Artificial Sequence

<220>

**<223> Primer**

**<400> 38**

..cagaggatcc agatgtacat gtctg

10  $\langle 210 \rangle$  39

**$\langle 211 \rangle$  25**

**$\langle 212 \rangle$  DNA**

## <213> Artificial Sequence

220

15 &lt;223&gt; Primer

**<400> 39**

tgctttccac attcttggg accct

**<210> 40**

**.<211> 2022**

20  $\langle 212 \rangle$  DNA

**<213> Human**

 $\langle 400 \rangle$  40

atggggcc!g gagg!tcagg ggacgggg!c agggac!ggga cagc!ccaca ca!agac!g 60

gactccagag t tggctcgca cgcctacgac atcagcgtgg tggtcatacta cttagcttc 120

25 gtcatgtctg tggggtctg gtctccatc cgtgcaagtc gagggaccat tggcggctat 180

ttccaggccg ggaggccat gaggcgggg ccaatggag calccicgat giccagcaat 240

300  
W16081113 88888888 c1gcccgggg cc1ggcgtt  
gt'ggggcggt'g gct'tgt'cat cggcc1ggg 1c8811c88

[illegible]

470

27/50

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 41

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5

5

10

15

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

20

25

30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

35

40

45

10 Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

50

55

60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65

70

75

80

Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly

15

85

90

95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu

100

105

110

Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val

115

120

125

20 Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln

130

135

140

Met Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile

145

150

155

160

Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly

25

165

170

175

Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val

180

185

190

Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu

195

200

205

28/50

Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly

210

215

220

Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln

225

230

235

240

5 Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg

245

250

255

Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro

260

265

270

Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp

10

275

280

285

Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu

290

295

300

Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu

305

310

315

320

15 Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

325

330

335

Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys

340

345

350

Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met

20

355

360

365

Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met

370

375

380

Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr

385

390

395

400

25 Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu

405

410

415

Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Phe Leu Val Val

420

425

430

Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln

29/50

30/50

435 440 445  
Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile  
450 455 460  
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro  
5 465 470 475 480  
Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg  
485 490 495  
Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp  
500 505 510  
10 Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile  
515 520 525  
Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys  
530 535 540  
Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Thr  
15 545 550 555 560  
Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr  
565 570 575  
Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly  
580 585 590  
20 Ala Ala Glu Asn Ser Ser Leu Gly Gln Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser  
595 600 605  
Arg Ser Trp Gly Lys Leu Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly  
610 615 620  
Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Leu Glu Gln  
25 625 630 635 640  
Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn  
645 650 655  
Ile Asn Ala Val Leu Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr  
660 665 670

Phe Ala

674

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 2022

5 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 42

atggggcttg gaggcttcagg ggaagggttc aggaclgaga cagctccaca catagcactg 60  
gactccagag ttggtctgca cgcclacgac atcagcgigg gggtcatctia ctttgtcttc 120  
gtcatcttg tggggatctg gtctccatc cglgcaagtc gaggagcaat tggcggctat 180  
ttcttgccag gagggtccat gaggctggg ccaatlgag catctctgat gtccagcaat 240  
gtggcagtg gcttggtcat cggcctgggt ggaacagggg ctgccggagg ccttgccgta 300  
ggggccttg agtggaaagc aaccggcg ctccggccc ttggcgggt cttgtccct 360  
gtgtacatcg cagcagggt gtgtcaaaag ccgagatc tgaagaagcg atttgggggc 420  
cagaggatcc aggtgtacat gtgtgtccg tctctatcc tctacatctt caccagatc 480  
tgcagtaca tcttctcgg agcctcttc atccagatgg catlgggtcg gaactgtac 540  
ctctccacag ggaacctgt gtgtgtgact gcgccttaca ccatlgcagg tggcctcatg 600  
ggcgtgact acacagatgc tctgcagacg gtgtatcatgg tagggggagc cctggcttc 660  
atgtttctg gcttccagg cgtggcgagg taccagagcc tggagcagcg gtacaggcag 720  
ggcatcctta atgtccaggt ccccaaccc accgtgacc tcccagccc cgaigtcttc 780  
cacattctc gggaccctgt gaggcgggac atcccttggc caggctctcat ttggggctc 840  
acagtgcgg ccacctgggt ttgggtgcaca gaaccaggtca ttgtgcagcg gtctctctcg 900  
ggcaagatc tgtctcagc caaggagagc tccgtgcagg ggggctacct gaagatcttc 960  
cccattctt tcatgtcat gccggcag atcagcggg cccgttccc agagaggag 1020  
ggctgcagg acctgatgt ctgccaaaga atctgtgggg ccgagatggg atgttccaa 1080  
attgtctacc ctaagtgggt catggccctc atgcctgtg gtctgcgggg gctgtgatt 1140  
ggcgtgata tggccgctct catgagctca ctacctcca tcttcaacag cagcagacc 1200  
cgtttcaca ttgattgtg gcagccttc cgcaggaggt caacagagca ggaagcgaig 1260  
gtgggggca gagtgttgt ggtgtctcgg gtgtcatca gcatctctg gatcccatc 1320

31/50

atccaaagct ccaacagagg gcagcctc gaciacatcc aggcgicac cagtlacctg 1380  
gcccacacca tcaccgctct ctctcgtcgt gccatctctt gcaagagggt cacagagccc 1440  
ggagccttct ggagccctcgt gtttggcctg agagtgagggc ttctgcgtat gattcctggag 1500  
ttctcatacc cagcgcaccg cttgaggag gtggaccgga ggccagcagt gctgaaggac 1560  
5 ttccactacc tgtactttgc aatctctc ttggggctca ctgccatcgt catgtcat 1620  
gtcagcctct gtacacatcc catctctgag gaacagctca cagccctcac atgttggaact 1680  
cggaaatgcc cctctctcga gctggagaag gagggccacg agagcacacc ggagataacc 1740  
gagagggccag cggggagtg ccttcagga ggttggagcgg cagagaactc gagcttgggc 1800  
caggagcagc ctgaagcccc agcaggctcc tgggggaaagt tgcctcggag ctggctcgt 1860  
10 ggctctctcgt gaacaccgga gcaggccctg agcccagcag agaagcctgc gctagaacag 1920  
aagctgacaa gcaatgagga ggagccactc tggagacatg tctgaacat caatcgtctc 1980  
cttttgcctgg ccaatcaaat ctctctcctgg agctattttg cg 2022

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 674

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 43

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5 10 15

20 His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

20 25 30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

35 40 45

Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

25 50 55 60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65 70 75 80

Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly

85 90 95

32/50

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu  
100 105 110  
Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val  
115 120 125  
5 Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln  
130 135 140  
Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile  
145 150 155 160  
Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly  
10 165 170 175  
Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val  
180 185 190  
Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu  
195 200 205  
15 Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly  
210 215 220  
Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln  
225 230 235 240  
Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg  
20 245 250 255  
Pro Asp Ala Phe His Ile Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro  
260 265 270  
Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp  
275 280 285  
25 Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu  
290 295 300  
Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu  
305 310 315 320  
Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe

33/50

34/50

325 330 335  
Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys  
340 345 350  
Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met  
355 360 365  
Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met  
370 375 380  
Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr  
385 390 395 400  
10 Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu  
405 410 415  
Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Val Phe Leu Val Val  
420 425 430  
Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln  
435 440 445  
15 Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile  
450 455 460  
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro  
465 470 475 480  
20 Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg  
485 490 495  
Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp  
500 505 510  
Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile  
515 520 525  
25 Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys  
530 535 540  
Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr  
545 550 555 560

Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr  
565 570 575  
Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly  
580 585 590  
5 Ala Ala Glu Asn Ser Ser Leu Gly Gln Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser  
595 600 605  
Arg Ser Trp Gly Lys Leu Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly  
610 615 620  
Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Ala Leu Glu Gln  
10 625 630 635 640  
Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn  
645 650 655  
Ile Asn Ala Val Leu Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr  
660 665 670  
15 Phe Ala  
674  
<210> 44  
<211> 30  
<212> DNA  
20 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 44  
ggactagctct acccgctgg cctctcggat  
25 <210> 45  
<211> 1755  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 45



35/50

30/50

atggggcttg gagctcagg ggaagggttc aggcagcaga cagctccaca catagcactg 60  
gactccagag ttggctcga cgcctagac atcagcgagg tggctatcia ctctgtcttc 120  
gtcatctg tgggcatctg gtctccatc cgtgcagtc gaggagccat tggcagctat 180  
ttctggccg gaggctcat gaggctgg ccaattggag catctcigtat gtccagcaat 240  
5 gtgggcagt gcttggcat cggcctggct gggacagggg ctgcaggagg ccttgccta 300  
ggctgttcg agtggagcg aacctggctg ctctggccc ttggctgggt ctctggccct 360  
gtatcatcg cagcaggtgt ggtcacatg ccgcagatc tgaagaagcg atttggggcg 420  
cagagatcc aggtgtaat gtctgtctg tctctcacc tctacatct caccagatc 480  
tcgactgaca tctctctgg agcctcttc atccagatgg catlgggctg gaacctgtac 540  
10 ctctccagc ggaatctgt ggtgtgact cgcgtctaca ccatlggcagg tggctcatg 600  
ggcgtgatc acacagatgc tctgcagcg gtatcatgg tagggggagc cctgtctctc 660  
atgtttcgg gctttcagga cgtggcgagg taccagggc tggagcagcg gtacaggcag 720  
gcaatcccta atgtacagt ccccaacac acctgtcac tccacggcg cgaatcttc 780  
cacatgttc gggacctgt gaggggggac atccctggc cagatctcat ttctgggctc 840  
15 acagtgcagg ccactlgtg ttggtagca gaccaggica ttgtgcagcg gtctctcag 900  
gcaagagtc tgtctcatc caaggggagc tccgtgtcgg gggactacct gaagatctc 960  
ccaatgtct tcatgtcat gctggcagc atcagccggg ccctgttccc agacaggtg 1020  
ggctgcgtgg acctgatgt ctgcaaga atctgtgggg cccagtggg atgttccaac 1080  
attgcctacc ctaagtgtgt catggccctc atgcctgtg gtctgggggg gctgataat 1140  
20 ggcgtgatca tggcgctct catgagctca ctcaactca tcttaacag cagcagacc 1200  
ctgttacc a ttgatgttg gtagcgcttc cgcaggaagt caacagagca gtagctgatg 1260  
gtggtaggca gagtgttgt ggtgttctg gtgtcatca gcatctctg gatcccatc 1320  
atccaaagct ccaacagtag gtagctctc gatcatcc aggcgtctac cagttaactg 1380  
gcccaccca tcaccgctct ctctctctg gccatctct gcaagagggt cacagagcc 1440  
25 ggggctttct ggggctctgt gtttggcctg aggttggggc ttctgggtat gatcttggag 1500  
ttctcatacc cagcgccagc ctgtggggag gtggaccgga gggcagcagt gcgtgaaggac 1560  
ttccactacc tgaacttgc aatctctctc tggggctca ctgcatctg catlgtat 1620  
gtcagctct gtacaatcc catctctgag gaacagctca cagcctcac atgttgact 1680  
cggaaatgcc cctctctga gctggagaag gaggccacg agagcacacc ggaatatcc 1740

gagagggcag ccggg 1755

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 585

&lt;212&gt; PRT

6 &lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 46

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5

10

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

10

20

25

30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

35

40

45

Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

50

55

60

15 Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65

70

75

80

Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly

85

90

95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu

20

100

105

110

Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val

115

120

125

Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gln Arg Ile Gln

130

135

140

25 Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile

145

150

155

160

Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly

165

170

175

Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Thr Ala Val

37/50

180 185 190  
Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu  
195 200 205  
Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly  
5 210 215 220  
Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Arg Tyr Arg Gln  
225 230 235 240  
Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg  
245 250 255  
10 Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro  
260 265 270  
Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp  
275 280 285  
Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu  
15 290 295 300  
Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu  
305 310 315 320  
Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe  
325 330 335  
20 Pro Asp Gln Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys  
340 345 350 355  
Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met  
360 365  
Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met  
25 370 375 380  
Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr  
385 390 395 400  
Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu  
405 410 415

38/50

Gln Gln Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Phe Leu Val Val  
420 425 430  
Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln  
435 440 445  
5 Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile  
450 455 460  
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro  
465 470 475 480  
Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg  
10 485 490 495  
Met Ile Leu Gln Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp  
500 505 510  
Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile  
515 520 525  
15 Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys  
530 535 540  
Thr Thr Pro Ile Pro Gln Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr  
545 550 555 560  
Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr  
20 565 570 575  
Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly  
580 585  
<210> 47  
<211> 26  
25 <212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 47

39/50

40/50

gtctttgtc ctcagtgga acttcc

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 48

tgcgcagc tcttgcctca tctgtt

10 &lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

15 &lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 49

tgaggtaacct gggagagacag agcagtcag

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 30

20 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 50

25 tgcctcagc tcttgcctca tctgttagtg

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 2254

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

26

&lt;400&gt; 51

tgggaagaca gagcagtcag gcagcagac actgtccttag tccatcccta ctgtacagc 60

aaaacacctt agaccaggta atttataag tacagggaatt taattctac aattctggag 120

gtcggagtc caagatcaaa gcccagcag gtttgggtc tggtagggc ccagctatg 180

5 cctccagac ggcaccttgt ggcgtgttcc tcacatggca gaagtaaaa agcacaagg 240

gctggcttag ttcccttagc cctttataa ggtactgac ccacccatga gggagaagcc 300

ctcacggctt aatcacctt aaaggcccta cctcttagta cgttgtcatt gggagattcag 360

tttaacatg aatttggaa gcaacacaag catccaact atagcaaac ccaagggtc 420

ggtagggggg ciccctgttg gtagcataga aagaagtaaa agactcagct gctctcccc 480

10 tgcacattcc ttttccatc tctgaagag tcatccggat ccagagccct cactatgg 540

tgcctcaggg cctaagctca gaccacctt tccctgtccc cigtattacc ccagagatc 600

tgcagctc attcccact gtcccgtat ccagctcacc ccagggacc actgggcacc 660

tggctatca caatttcttg atgtttctaa tgcggccct cctgcattcc tgttctctg 720

ataacttgc ctttaaacgt gtatatgaag gactcttctt ctggtatcta atcctaacag 780

15 gtcttagatc ccacagacc ctgtccagct ggggactatg ctgacctc tcccagatca 840

atatcctct cctcgggct cagcttgcc agtgcctgat gtctgggat agaggaactg 900

gggagagaag gcttaggacc ctgctctca ctttcttcc caccataagg ggaataaaga 960

ggatctggtc ctacacca gccctgggat acttataaa tgc-tgggat aggggttggg 1020

acagggccag tagagcttg gga-tgggtg tggacacgg ccagttagat ctgtttctt 1080

20 gctgtccag tctgggctt acagcagatg catcagagat aatattgta agactgaat 1140

attccaatg cagctacttt ggaaggacca tcttagcaga tatctaagt cctggcatct 1200

gggccccttg gctagatgtt ggtcgtatgt ggttctttg tgttaacc aagaacattc 1260

agtactcag ggtttcaga ggttctcag agcatctt agcctatg gtgtttag 1320

gcagtcagg gcaggtcac actgatgagg acaccgggc ccagagacat tttagcaact 1380

25 gcccagggc atcttagtt cagttagagg tggagctgg actgaatct aggttgcctg 1440

agtccagag atgttctcc ctggaccag gtagcactgt atcttttca gggagagctt 1500

cctgaccaca accatttcat ctgtcacagt acagaatagg aagta-tgggt caggcatcag 1560

aaga-tgaa tcttggtct gctttttag agatggcctt gcttagtccc ttgaataaa 1620

tgatgatgtc ttcccagcc tcaatttctt acattatata aaaaagaaa gcacatctta 1680

41/60

42/60

ggtaggctgg aatggagta catgagctgg tggcaattt gctagggtca cagtagactc 1740  
 ctacacctt tcccctgtc ttctctctac taggtaaaag acaatlgat tgaactctta 1800  
 agaaaattgg actccagctc cggctccacc ttacttccc tgggcttgg ttctccacc 1860  
 acacagaggt tgaacactl tgaattctga agctctccc acccttgggg ttcaaatl 1920  
 5 ctgcctctt tctctcttc ctctccccc tcttctccc tcttctctc ctggggttag 1980  
 ggaatattgg tgaatgtg tgcctgtg tacaaatgca tgaatgtg tgcacgtat 2040  
 ggcagcaagg aagaggaagg aaggagctct gcagggttg gtgtggcag tggagagaa 2100  
 agagggcagg actgatatg ccagtagggc tcaagattt ctacaaact aatgtgctt 2160  
 gggcaggtt aatcaataa ggaaggaaat gaagcagga gcgcctcaaa gtccagctg 2220  
 10 cigttagca acataacag atgagcaagg agct 2254

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

15 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 52

tctaatgtc cctctctgc atccc

25

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 53

gggactatgc tgcctctct cccag

25

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 2254

&lt;212&gt; DNA

<213> Human  
 <400> 54  
 tgggaagaca gagatgcag gcagcagaac acgtctctag tccatcccta ctgtacagc 60  
 aaacacctta agaccaggta attataag tacaggaaat tattctcac aatttggag 120  
 5 gctggagagc caaatcaaaa gcccagcag gtttgggtg tggtagggc ccagictatg 180  
 cctccaaagc ggcacctgt ggcgtgtcc tcaatggca gaaggtaaaa aggcataagg 240  
 gccctgttag ttcccttagc cctttataa ggtacigalc ccacccaaga gggagaagcc 300  
 ctacaggct aatcactct aaggcccta cctcttagta cgttgcatt gggagattcag 360  
 tttaacaatg aatttggaa gcaacaaag catccaact atagcaaac ccagggtctg 420  
 10 ggtgaggggg ctcttgtgg ggaagcataga aagaatgata agactagct gtcttccc 480  
 tgcacatccc ttctccalc tctgaagag tcatccgat ccagagccct cactatggtg 540  
 tgcacaggg cctaagctca gaccactct tccctgtcc ctgattaca cccagagatc 600  
 tgcagcttc attcccact gtccctgat ccagctcacc cccaggagcc aciggagacc 660  
 tggctcatca catcttcttg atgttctaa tgcgtccct cctgcatccc tgttctctg 720  
 15 ataaacttgc ctttaacgt gtatagaag gacttctct ciggatctata atctaaacag 780  
 gtgttagatc ccacagagcc ctgtccagt ggggactatg ctgtctctc tccagatca 840  
 atatccctct cctcggggt cagctggcc agtgcctgat gttctggat agagagactg 900  
 gggagagaag gcttaggacc ctgccttca ctcttcttc caccataagg ggaataaaga 960  
 ggaatctggc ctacaccca gcttgggat acttaaga tgcaggagat aggtgtggg 1020  
 20 acaggccag tagagctgg ggaatgggtg tggacaggg ccagttagat ctgttctct 1080  
 gctgtccag tctgggccc acagcagatg catgcagagt aatattgta agactgaat 1140  
 attcaaatg cagctacttt ggaaggacca tctgacaga taictaagtg cgtggcatct 1200  
 gggcccttgg gctagatgtt ggtctatgtt ggttcttgg tctaaccac aagaacatc 1260  
 agtagctcag ggttgcaga ggttctcagg agcatcttt agctctatg gtgtgttag 1320  
 25 gcaggcaggg cacaggtcac actgatgagg acaccgggc ccagagacat ttgcacact 1380  
 gcccagggc atctagttt cagtgaagg tggagctgg acigaaatc aggtgtctg 1440  
 agtccagag atgtcttccc ctggaccag ggaactatgt atcttttca ggaagagct 1500  
 cctgaccaca accatttcal ctgtcacagt acagaaagg aagtatgggt caggcatcag 1560  
 aagaatgaa tctggctct gcttctcag agatggccc gcttagtcc ttggaataa 1620

43/50

tgaatgagtc ttcccagcc tcaatttccct acaciatata aaaagagaaa gcaacalcia 1680  
 ggtaggatgg aatggagagta catgaggtagg tggccacttt gctagggtca cagtagactc 1740  
 ctcccctct tcccctgtc ttccctcac taggtaaaag acaatttgtat tgaactctta 1800  
 agaaaaatgg actccagtc ccgtccacc ttacttccc tgggcttgg ttctccacc 1860  
 5 acacagaggt tgaacactt tgaattciga agtcttccc accctcggg ttcaaalatt 1920  
 ctgctcttt tctctcttc ctctccccc tctttctcc tctgtctat ctggggttag 1980  
 ggaatttgg tgaatgtg tgcctgtg tacaalga tgaatgtg tgcagtagt 2040  
 ggcagcaagg aagagaagg aaggagtcct gcagggttg gtggtggcag ttggagaaa 2100  
 agggagcagg actgtagtg ccagcaggcc tcaagatttt ctcaaacct aatggtgctt 2160  
 10 gggcagattt aatcattaaa ggaaggaaat gaagccagga gcgcctcaaa gtccagcttg 2220  
 ctgttgacca acactaacag atgagcaagg agct 2254  
 <210> 55  
 <211> 2254  
 <212> DNA  
 15 <213> Human  
 <400> 55  
 tggaaagaca gagcatgcag gcagcagaac actgtcttag tcaatcccta ctgcacagc 60  
 aaacacccta agccagagta atttataag tacaggaaatt tatttctcac aattcggag 120  
 gctgggaagtc caagatcaaa gcccagcag gtttgggtc tggtagggc ccagctatg 180  
 20 ctctcaagac ggcacttgtt ggcgtgtcc tcaatggca gaaggtaaaa aggcataagg 240  
 gccctggctag ttcccttagc ccttttataa ggtactgac ccacccaatga gggagaagcc 300  
 ctacaggctt aatcactctt aaaggcccta cctcttagta ctgttgcat tgggattcag 360  
 ttccaatg aattttgaa gcaacacaag catcaact atagcaaac ccaagggtg 420  
 ggtggagggg cttcttgg ggaacataga aagaatga agactcagct gtcttctccc 480  
 25 tgcacattcc ttctccatc tctggaagag tcatccagat ccagagccct cactatggtg 540  
 tgcctagagg cctaagctca`gaccactcct tcccgtctc ctgattaca ccagagatc 600  
 tgcagctc attcccact gtcccgtat ccagctcacc ccagggacc acttggacc 660  
 tggctcaatc cattttcttg atgtttctaa tgcgtctct ccgtatccc tgttctctg 720  
 ataaacttgc`ctttaaact gtatatgaag gactcttctt ctgtatatata atccaaag 780

44/50

ggtctagatc ccaagagcc ctgtccagct ggggactatg ctgacctc tccagatca 840  
 atatccctct cctggggct cagctggcc agtgcctgat gtctgggat ggaagacatg 900  
 gggagagaag gcttaggacc ctgccttca ctttcttct caccataagg ggaataaaga 960  
 ggaatggct ctacacca gccctgggat actataaga tgcctgggat ggggttggg 1020  
 5 acaggccag tagagctgg ggaatgggtg tggacaggg ccagtagat ctgtttctt 1080  
 gctgtccag tctgggccc acagcagatg catgcagagt aatatttga agactgaat 1140  
 attccaaatg cagctacttt ggaagagcca tatgagcaga taticlaagtg cgtggcatct 1200  
 gggcccttgg gctagatgg gtgtcatgtt ggtttcttg tgttaaccc aagaacattc 1260  
 agtagctcag ggtttgcaga ggtctcagg agcacatct agctcatg gtggtgtgag 1320  
 10 gcaggcagg cacaggctac actgtaggg acaccgggc ccagagacat ttgcaacct 1380  
 gcccaggcc atcttagtt cagttagagg tggagctggg actgaatct aggtgctctg 1440  
 agtccagag atgtcttcc ctggacccag ggaactgt atcttttca gggaaaggct 1500  
 ccagacaca accatttcat ctgtcacagt acagaatagg aagtaaggc caggcatcag 1560  
 aagatgtgaa tctggctct gccctttcag agatggccct gccctgttcc ttggaataaa 1620  
 15 tgaatgctc ttcccagcc tcaatttctt acactata aaaaagaaa gcaacalcia 1680  
 ggtaggtag aatggagta catgaggtag tggccatttt gctagggtca cagttagctc 1740  
 ctacactct tcccctgtc ttctctcac taggtaaaag acaattgtat tgaactctta 1800  
 agaaaatgg actccagtc ccgtcccacc ttacttccc tgggcttgg ttctccacc 1860  
 acacaggagt tgaacactt tgaattcga agtcttccc accctgggg ttccaatatt 1920  
 20 ctgtctcttt tctctcttc ctctccccc tctttctcc tctgtcat ctggggttag 1980  
 ggaatttgg tgaatgtg tgcctgtg tacacatga tgaatgtg tgcagtagt 2040  
 ggcagcaagg aagagaagg aaggagctct gcagggttgg gtggtggcag ttggagaaa 2100  
 agggaggcagg actgtagtg ccagcaggcc tcaagtttt ctcaaacct aatggctct 2160  
 gggcagattt aatcattaaa ggaaggaaat gaagccagga gcgcctcaaa gtccagcttg 2220  
 25 ctgttgacca acactaacag atgagcaagg agct 2254  
 <210> 56  
 <211> 2254  
 <212> DNA  
 <213> Human

45/50

46/50

&lt;400&gt; 56

tgggaagaca gagcatgcag gagcagagac acigtccttag tccatcccta ctcgacagc 60  
 aaacacccia agaccaggta attataaag tacaggaatt tattctcac aattctggag 120  
 gcctgaagtc caagatacaa gccccagcag gtttggctc tggtaggggc ccagctatg 180  
 5 cctccaagc ggcaccttgt ggcctgtcc tcacatggca gaaggtaaaa aggcataaag 240  
 gcttggctag ttcccttagc cccttataa ggtactgac ccaccatga gggagaagcc 300  
 ctacaggct aatcacacct aaaggcccta ccctttagta cgttgtcatt ggggatticag 360  
 tttaacatg aatttggaa gcaacaaag catcaaat atagcaaac ccaagggtg 420  
 ggtgagggg ctccttggg ggagcataga aagaagtaaa agactcagct gcttctccc 480  
 10 tgcacattcc ttltccatc tcgggaagc tcatccagat ccagagccct cactatggg 540  
 tgcacagag ctaagctca gaccacctc tcccgtctc ctagtaaca ccagagatc 600  
 tgcagccctc attcccact gtcccgtat ccagctcacc ccagggacc actgggcacc 660  
 tggctcatc catttcccg atgtttctaa tgcctctct ccctgctccc tgttctcgt 720  
 ataaactgc ctttaacgt gtatatgaag gactcttct cgtatctta atcttaacag 780  
 15 gtgtctagtc ccacagagcc cgtctcagct ggggactatg cgtctctc tccagatca 840  
 atatccctc cctcgggct cagctggcc agtgcctgat gttctggat agagagaac 900  
 gggagagag gccctaggacc cgtctctca ctttcttc caccataagg ggaataaaga 960  
 ggaatggc ctacaccca gccctggat actataaga tgcctgggat agggctgagg 1020  
 acagggccag tgaagagctgg ggaagggtg tggagacagg ccagtagaat cgttttctc 1080  
 20 gcctgtccag tctgggccc acagcagaig catgcagat aatatgtga agactgaat 1140  
 attcaaatg cagctactt ggaaggacca tctgagcaga tatctaagtg cgtggcatct 1200  
 gggccctctg gctagatggt ggtcgaigt ggtttcttg tgttaaccc agaaacatc 1260  
 agtagctcag ggtttgcaga ggtctcagg agcaatcct agccctattg gttgtgtgag 1320  
 gcagcgagg cacagctac actatgagg acaccaggc ccagagacat ttagaacct 1380  
 25 gcccaaggc atctgtagt cagtagaggg tggagctggg actgaatct aggcctcctg 1440  
 agtccacag atgctctcc ctgaccagg gggacactg atcttttca ggaaggccct 1500  
 cctgaccata accattcat cgtcacagt acagaatagg aagtatgggt caggcatcag 1560  
 agatgtgaa ttctggctct gctttttcag agatggccc gcttagtccc ttggaataa 1620  
 taatgtgtc ttcccagcc tcaagtctct acatatata aaagagaaa gcaacatcta 1680

ggtaggttgg aatggagta catgaggagg tggccacttt gctagggtca cagtagactc 1740  
 ctacacctc tccctgtgc ttctctcac taggtaaaag acaattgtat tgaacttcta 1800  
 agaaaattgg actccagctc cggctccacc ttactctccc tgggcttgg ttteccacc 1860  
 acacaggagt ttgaacactt tgaattctga agtctctccc acctctgggg ttccaatatt 1920  
 5 ctgctcttt tctctctct ctcctcccc tcttctccc tctgtctcat ctggggtag 1980  
 ggagattggc tgaatgtg tgcctgtgtg tacacatgca tgaatgtgtg tgaactagt 2040  
 ggacagaagg agaggaagg aaggagctct gcaagggttg gttgggcag ttggggagaaa 2100  
 agggagcagg actgtatgt ccagcagggc tcaagatttt ctaccaact aatgg'tgctt 2160  
 gggcagtttt aatcatataa ggaagggaat gaagccagaa ggcctcaaa gtccagcctg 2220  
 10 ctgtgacca acataaacag atagcaagg agct 2264

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 57

agaggtaccg gctctcacac ccagccttg

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 58

attgttaccg agtcccagct gcacctta

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

47/50

48/50

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 69

5 ggatcagagg agtctactgt gac

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

10 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 60

ttgtggggag catagaaga agt

&lt;210&gt; 61

15 &lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

20 &lt;400&gt; 61

caaggciggg tgtaggac

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 62

aggcctaagc tcagaccact cc

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

5 &lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 63

gatccatcca aggtcacag

&lt;210&gt; 64

10 &lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

15 &lt;400&gt; 64

cttcccctca gcaacagca cat

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 65

ggcctccac agcatagcac t

25 &lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

22

19

23

20

21

49/50

50/50

<223> Primer  
<400> 66  
ggcgggctt gctgagtagc a  
<210> 67  
6 <211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
10 <400> 67  
gcagcgagg tagagagag g  
<210> 68  
<211> 22  
<212> DNA  
15 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 68  
gacaggclea gtgggtttc ag  
20 <210> 69  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
25 <223> Primer  
<400> 69  
tagacaagc ctgggtaga g  
<210> 70  
<211> 24

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
5 <400> 70  
cgtgggaaag gagttagggg gata  
<210> 71  
<211> 24  
<212> DNA  
10 <213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Primer  
<400> 71  
tgctcttgt acctcttgct ttig

21

21

22

21

24

24



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11557

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

A according to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/Geneseq, Genbank/EMBL/DBJ/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TARPEY, P. et al., "Amino acid sequence and the cellular location of the Na(+)-dependent D-glucose symporters (SGLT) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell", <i>Biochem. J.</i> , (1995), 312:293-300	1-30, 39, 40, 45, 52-59
A	PAJOR, A. M., "Sequence of a putative transporter from rabbit kidney related to the Na+/glucose cotransporter gene family", <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , (1994), 1194 (2):349-351	1-30, 39, 40, 45, 52-59
A	TURK, E., MARTIN, M. G., WRIGHT, E. M., "Structure of the human Na+/glucose cotransporter gene SGLT1", <i>J. Biol. Chem.</i> , 27 May, 1994, 269(21):115204-9.	1-30, 39, 40, 45, 52-59
A	YANG, Q. et al., "Expression characteristics and relevance of sodium glucose cotransporter-1 in mammalian renal tubulogenesis", <i>Am. J. Physiol. Renal Physiol.</i> , (2000), 279(4):1765-1777	1-30, 39, 40, 45, 52-59

\* Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	* Later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such document being obvious to a person skilled in the art
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	"Z" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of this actual completion of the international search 20 February, 2002 (20.02.02)

Date of mailing of the international search report 05 March, 2002 (05.03.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/11557

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reason:

1. ☒ Claims Nos.: 46-49, 70

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 46 to 49 and 70 pertain to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods.

2. ☒ Claims Nos.: 31-38, 41-44, 50, 51

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Although the statement in the description is taken into consideration concerning the "compounds" and "salts" as described in claims 31 to 38, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scopes thereof and what are not. Also, claims 41 to 44, 50 and 51 depending on the above claims 31 to 38 are unknown for the same reason. Such being the case, these claims are described in an extremely unclear manner.

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(g).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53</p>	<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int. Cl. C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, A61K39/00, A61K45/00, A61K48/00, A61P3/06, A61P3/10, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53</p>
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p>	<p>国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>MEDLINE, BIOSIS/DIALOC, PFI (DIALOC)</p> <p>SwissProt/PIR/GenSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GenSeq</p>
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <p>引用文献の カテゴリ *</p> <p>A</p> <p>TARPEY P. et al. Amino acid sequence and the cellular location of the Na (+)-dependent D-glucose symporters (SGLT) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell. Biochem. J. 1995, 312:293-300</p>	<p>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</p> <p>関連する 請求の範囲の 番号</p> <p>1-30, 39, 40, 45, 52-69</p>
<p>図の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>	<p>* 引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの</p> <p>「B」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に基礎を絶する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等による文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>
<p>国際調査を完了した日</p> <p>20. 02. 02.</p>	<p>国際調査報告の発注日</p> <p>05.03.02</p>
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本特許庁 (ISA/JPT)</p> <p>郵便番号 100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番9号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>上級 査</p> <p>4 B 3037</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>

国際調査報告

国際出版番号 PCT/JP01/11557

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないとき意見 (第1ページの2の続き)  
 法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成できなかった。

1. ☒ 請求の範囲 46-49, 70 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない状態に係るものである。つまり、請求の範囲 46-49及び70に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 31-38, 41-44, 50, 51 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、請求の範囲 31-38に記載の「化合物」及び「塩」について、明細書の記載を参照しても、具体的にどのような化合物が含まれ、どのような化合物が含まれないかが全く不明である。また、前記請求の範囲 31-38を引用する請求の範囲 41-44, 50及び51の記載も同様の理由により不明である。したがって、前記請求の範囲は著しく不明瞭である。

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているとき意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみが期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の戻還の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から戻還申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から戻還申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続き (1)) (1998年7月)